Hayati, September 2002, hlm. 94-96 Vol. 9, No. 3
ISSN 0854-8587

CATATAN PENELITIAN

Teknik RAPD Kelapa dengan Metode Ekstraksi DNA dan Kit PCR yang Berbeda

Coconut RAPD Technic Using Different Methods of DNA Extraction and PCR Kits

SEMUEL D. RUNTUNUWU[1‡*], ALEX HARTANA[1,2], SUHARSONO[2]

[1]Laboratorium Biologi Tumbuhan, Pusat Studi Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
[2]Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 3 Oktober 2001/Disetujui 10 Mei 2002

The objectives of this research were to compare the results of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of coconut DNA, extracted using either liquid nitrogen or sea sand, and amplified with different PCR kits. There was no significant differences of DNA banding petterns of coconut DNA, extracted using either liquid nitrogen or sea sand, and PCR kits used for the amplification reactions.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) adalah suatu teknik molekuler untuk mendeteksi keragaman DNA yang didasarkan pada penggandaan DNA secara berantai (*polymerase chain reaction*, PCR). Penggandaan DNA menggunakan primer acak tunggal yang umumnya berukuran 10-mer dalam mesin *thermal cycler*. Teknik ini banyak digunakan untuk menganalisis keragaman genetika tanaman.

Prinsip teknik RAPD didasarkan pada kesamaan urutan basa secara komplemen antara primer dengan DNA cetakan (*template DNA*). Apabila terdapat kesamaan urutan basa di antara keduanya maka primer akan menempel (*annealing*) pada kedua utas DNA cetakan di dua situs (*sites*) yang berbeda. Kalau kedua situs penempelan primer berada dalam jarak yang dapat diamplifikasi maka akan diperoleh produk PCR berupa pita DNA yang dapat dilihat dalam gel agarosa setelah diwarnai dengan pewarna DNA, seperti etidium bromida (Tingey *et al*. 1992, Sambrook *et al*. 1989). Di samping ditentukan oleh ada tidaknya situs penempelan primer, keberhasilan teknik ini ditentukan juga oleh kemurnian DNA cetakan dan keutuhannya. DNA cetakan yang tidak murni akan mengganggu penempelan primer pada situsnya dan akan menghambat aktivitas enzim polimerase DNA (*DNA polymerase*) yang berfungsi untuk melakukan polimerisasi DNA. DNA cetakan yang banyak mengalami fragmentasi dapat menghilangkan situs penempelan primer.

Untuk mendapatkan DNA cetakan yang murni dan sedikit mengalami fragmentasi, metode ektraksi DNA umumnya menggunakan nitrogen (N_2) cair pada saat menggerus sampel. Akan tetapi, ketersediaan N_2 cair sering menjadi masalah maka perlu dicari alternatif penggantinya. Pasir kuarsa yang umum digunakan dalam mengektraksi isozim tanaman kelapa, diduga dapat dijadikan pengganti N_2 cair. Rohde *et al*. (1995) telah menggunakan pasir kuarsa dalam mengekstraksi DNA total tanaman kelapa, tetapi tidak membandingkan hasil amplifikasi PCR antara DNA yang diekstraksi dengan N_2 cair dan DNA yang diekstraksi menggunakan pasir kuarsa. Oleh karena itu, perlu dibandingkan hasil amplifikasi PCR DNA yang diekstraksi dengan N_2 cair dan pasir kuarsa untuk mengetahui apakah pasir kuarsa dapat digunakan dalam analisis RAPD kelapa.

Seperti sudah tersirat dalam pembahasan di atas, faktor lain yang turut mempengaruhi keberhasilan teknik RAPD ialah enzim polimerase DNA, suatu enzim tahan panas yang umumnya diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*). Enzim ini berperan untuk menggabungkan satu basa dengan basa lain berdasarkan urutan basa secara komplementer dari DNA cetakan pada temperatur tinggi (72^{0}C). Polimerisasi DNA diawali pada ujung 3'OH dari primer. Enzim *Tag DNA polymerase* pada masa kini tersedia dalam beberapa macam kit, seperti *Ready-To-Go PCR beads* dari Pharmacia Biotech, *PCR Core System I* dari Promega, dan *AmpliTaq* dari Perkin Elmer. Setiap kit mempunyai komposisi dan cara meramu yang berbeda. Oleh karena itu, hasil amplifikasi PCR dari produk kit PCR tersebut di atas perlu dibandingkan untuk mengetahui apakah ada perbedaan profil pita DNA yang dihasilkan antarkit PCR yang berbeda. Penelitian ini bertujuan membandingkan hasil amplifikasi PCR DNA tanaman kelapa yang diekstrak dengan N_2 cair dan pasir kuarsa, menggunakan kit PCR *Ready-To-Go PCR beads*, *PCR Core System I*, dan *AmpliTaq*.

‡ Alamat kini: Jurusan Budi Daya Pertanian, Faperta, Universitas Sam Ratulangi, Manado 95115
* Penulis untuk korespondensi, E-mail: semuel-dr@usa.dat

DNA cetakan yang diamplifikasi ialah DNA total tanaman kelapa Genjah Salak (GSK) dan kelapa Dalam Bali (DBI) koleksi Loka Pola Tanam Kelapa (Lolitka) Pakuwon, yang diekstrak dari daun kelapa muda mengikuti Rohde *et al*. (1995). Kedua tanaman kelapa tersebut dipilih sesuai dengan sampel daun kelapa yang tersedia, dan untuk melihat kekonsistenan hasil amplifikasi PCR antargenom tanaman kelapa yang berbeda. DNA kelapa masing-masing digerus secara terpisah menggunakan N_2 cair dan pasir kuarsa. DNA yang diekstraksi diukur absorbansinya pada dua panjang gelombang, A_{260} dan A_{280}, untuk ditentukan kuantitas dan kemurniannya, kemudian dielektroforesis dalam gel agarosa 0.8% dan diwarnai dengan etidium bromida untuk dilihat keutuhannya di atas lampu UV transiluminator.

Berdasarkan perbandingan nilai absorbansi A_{260}/A_{280}, kemurnian DNA kelapa yang diekstrak menggunakan N_2 cair dibandingkan dengan yang diekstrak menggunakan pasir kuarsa, ternyata kemurnian DNA kedua hasil ekstraksi cukup tinggi, yaitu berturut-turut rata-rata 1.86 dan 1.87 (Tabel 1). DNA yang dianggap cukup murni mempunyai perbandingan A_{260}/A_{280} = 1.80-2.00 (Sambrook *et al*. 1989).

Kalau dilihat nilai rata-rata kemurnian DNA, ternyata kemurnian DNA kelapa yang diekstraksi dengan pasir kuarsa relatif sama dengan kemurnian DNA yang digerus dengan N_2 cair. N_2 cair umum digunakan dalam ekstraksi DNA karena temperaturnya yang sangat rendah (-180^{0}C) dapat mengeringkan daun secara cepat sehingga daun mudah digerus dan menginaktifkan enzim-enzim, terutama enzim yang mengoksidasi senyawa fenolik. Pada prosedur ekstraksi dengan pasir kuarsa, bufer ekstraktan yang mengandung β-merkaptoetanol (suatu senyawa antioksidan) langsung ditambahkan pada saat sampel digerus sehingga senyawa antioksidan dapat menghambat oksidasi senyawa fenolik yang banyak dikandung oleh daun kelapa.

DNA total kelapa yang diekstrak dengan N_2 cair relatif utuh (memiliki fragmen DNA yang berukuran besar) dibandingkan dengan DNA yang diekstrak menggunakan pasir kuarsa. Hasil elektroforesis DNA kelapa dalam gel agarosa memperlihatkan bahwa fragmentasi terjadi lebih banyak pada DNA yang diekstrak dengan pasir kuarsa, tetapi fragmen DNA kelapa yang diekstrak dengan pasir kuarsa masih banyak yang berukuran besar (berukuran > 23 kb). Fragmen DNA yang berukuran besar tersebut memenuhi salah satu syarat yang diperlukan dalam teknik RAPD (Gambar 1).

Fragmentasi DNA kelapa yang diekstraksi menggunakan pasir kuarsa lebih banyak dari yang diekstraksi menggunakan N_2 cair karena butiran-butiran pasir kuarsa selain dapat memisahkan sel-sel daun, dapat juga merusak keutuhan DNA.

Tabel 1. Kemurnian DNA kelapa GSK dan DBI yang diekstrak menggunakan N2 cair dan pasir kuarsa

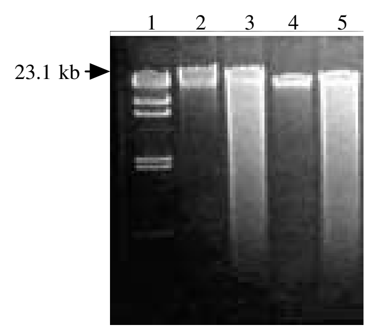
Kelapa	N_2 cair		A_{260}/A_{280}	Pasir kwarsa		A_{260}/A_{280}
	A_{260}	A_{280}		A_{260}	A_{280}	
	.... µm			.... µm		
GSK	0.216	0.114	1.89	0.318	0.167	1.90
DBI	0.172	0.094	1.83	0.796	0.432	1.84
Rata-rata			1.86			1.87

GSK: kelapa Genjah Salak, DBI: kelapa Dalam Bali, A: Absorbansi

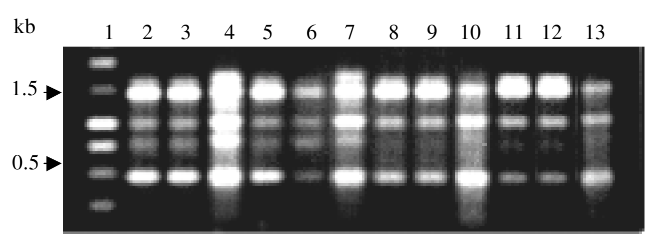
Oleh karena itu, jumlah pasir kuarsa yang digunakan untuk menggerus daun harus seminimum mungkin. Rohde *et al*. (1995) mengekstraksi DNA kelapa dengan perbandingan 50 mg pasir kuarsa untuk 1 g daun. Penelitian ini menggunakan perbandingan bobot pasir kuarsa dan bobot daun seperti tersebut di atas.

Amplifikasi PCR DNA total tanaman kelapa dilakukan menggunakan mesin *GeneAmp PCR System 2400 Thermal* Cycler (Perkin Elmer) dengan kondisi PCR: (i) pre-PCR 94^{0}C/5 menit, (ii) denaturasi DNA 94^{0}C/1 menit, (iii) pelekatan primer 37^{0}C/1 menit, (iv) pemanjangan DNA 72^{0}C/90 detik, dan (v) *post*-PCR 72^{0}C/5 menit. Tahap i-iv dilakukan sebanyak 35 siklus. Reaksi PCR dilakukan mengikuti protokol baku dari masing-masing kit PCR yaitu *AmpliTaq* dari Perkin Elmer (A-PE), *PCR Core System I* dari Promega (PCSI-P), dan *Ready-To-Go PCR beads* dari Pharmacia Biotech (RTG-PB) dengan 50 ng DNA cetakan dan 5 pMol primer kit A nomor 8 dan 9 (OA-8 dan OA-9) dari Operon.

Amplifikasi DNA kelapa menggunakan primer OA-8 dan OA-9 menghasilkan profil pita DNA yang berbeda. Primer OA-8 menghasilkan lima pita DNA yang berukuran antara 0.5-1.5 kb pada kelapa GSK dan empat pita DNA yang juga berukuran antara 0.5-1.5 kb pada kelapa DBI, sedangkan primer OA-9 menghasilkan empat pita DNA yang berukuran antara 0.2-1.2 kb, baik pada kelapa GSK maupun kelapa DBI. Berikut ini ditampilkan profil pita DNA kelapa yang diamplikasi menggunakan primer OA-8 (Gambar 2).



Gambar 1. Elektroforesis DNA kelapa dalam gel agarosa. Penanda ukuran DNA λ/HindIII (lajur 1); DNA kelapa GSK yang diekstraksi menggunakan N_2 cair (lajur 2) dan pasir kuarsa (lajur 3); DNA kelapa DBI yang diekstraksi menggunakan N_2 cair (lajur 4) dan pasir kuarsa (lajur 5).



Gambar 2. Amplifikasi PCR DNA kelapa menggunakan primer OA-8. Penanda ukuran DNA 1 kb *DNA ladder* (lajur 1); DNA kelapa GSK (lajur 2-4) dan DNA kelapa DBI yang diekstraksi menggunakan pasir kuarsa (lajur 8-10); DNA kelapa GSK (lajur 5-7) dan DNA kelapa DBI yang diekstraksi menggunakan N_2 cair (lajur 11-13); Diamplifikasi menggunakan kit A-PE (lajur 2, 5, 8, dan 11); Diamplifikasi dengan kit PCSI-P (lajur 3, 6, 9, dan 12); Diamplifikasi dengan kit RTG-PB (lajur 4, 7, 10, dan 13.

Ekstraksi DNA cetakan menggunakan pasir kuarsa tidak mempengaruhi hasil amplifikasi PCR DNA kelapa. Hasil amplifikasi PCR DNA kelapa yang diekstraksi menggunakan pasir kuarsa ternyata tidak berbeda dengan yang diekstraksi menggunakan N_2 cair. DNA kelapa GSK yang diekstraksi menggunakan pasir kuarsa (lajur 2-4) mempunyai profil pita DNA yang sama dengan yang diekstraksi menggunakan N_2 cair (lajur 5-7), masing-masing mempunyai lima pita DNA dan masing-masing pita DNA berukuran sama. Hasil yang serupa juga terlihat pada DNA kelapa DBI (Gambar 2). Oleh karena itu, pasir kuarsa dapat disarankan untuk digunakan dalam analisis RAPD kelapa.

Amplifikasi PCR DNA kelapa menggunakan kit PCR *AmpliTaq* dari Perkin Elmer (A-PE), *PCR Core System I* dari Promega (PCSI-P), dan *Ready-To-Go PCR beads* dari Pharmacia Biotech (RTG-PB) ternyata juga menghasilkan profil pita DNA yang sama. Lajur nomor 2, 5, 8, dan 11 memperlihatkan profil pita DNA yang diamplifikasi menggunakan kit PCR A-PE, lajur nomor 3, 6, 9, dan 12 memperlihatkan profil pita DNA yang diamplifikasi menggunakan kit PCR PCSI-P, dan lajur 4, 7, 10, dan 13 memperlihatkan profil pita DNA yang diamplifikasi menggunakan kit PCR RTG-PB. Walaupun hasil amplifikasi PCR ketiga kit memperlihatkan profil pita DNA yang sama, tetapi intensitas pita DNA yang dihasilkan sedikit berbeda. Intensitas pita DNA yang relatif lebih tinggi dihasilkan oleh kit RTG-PB diikuti oleh kit A-PE dan kit PCSI-P.

Perbedaan intensitas tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan formulasi antarkit PCR tersebut. Kit RTG-PB mengandung senyawa penstabil, bufer [KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, dan Tris HCl 10 mM pH 9], dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP] masing-masing 200 µM, dan 1.5 u *Taq DNA polymerase* (Pharmacia Biotech 1997), kit A-PE mengandung bufer [KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 9, dan Triton ® X-100 0.001%], dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP] masing-masing 200 µM, 1 u *Taq DNA polymerase*, dan $MgCl_2$ 2.5 mM, sedangkan kit PCSI-P mengandung bufer [KCl 500 mM, Tris HCl 100 mM pH 9, dan Triton ® X-100 1%], dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP] masing-masing 200 µM, $MgCl_2$ 2.5 mM, dan 1.25 u *Taq DNA polymerase* (Promega 2000). Intensitas pita DNA yang lebih tinggi pada kit RTG-PB kemungkinan disebabkan oleh keberadaan senyawa penstabil dan karena enzim *Taq DNA polymerase* yang lebih banyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Hibah Tim Penelitian Pascasarjana (URGE) No: 038/ADD/I/HTTP/URGE/1997 a.n. Alex Hartana dengan judul: *Molecular genetic analysis of Indonesian coconut germplasm for crop improvement in breeding programs.*

DAFTAR PUSTAKA

Pharmacia Biotech. 1997. Pre-mixed, pre-dispensed, room-temperature-stable reaction mixes for reproducible PCR. *Science Tools* 2:6-7.

Promega. 2000. *PCR Core Systems*. Technical Bulletin No. 254. Madison: Promega Corporation.

Rohde W, Kullaya A, Rodrigues J, Ritter E. 1995. Genome analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of *copia-like Eco*RI repetitive elements. *J Genet Breed* 49:179-186.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory.

Tingey SV, Rafalski JA, Williams JGK. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. Di dalam: *Proceeding Application of RAPD technology to plant breeding*. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, 1 Nov 1992. Madison: CSSA/ASHS/AGA. hlm 3-8.