

Optimalisasi Isolasi DNA Genom Tanaman Obat Menggunakan Metode CTAB Tanpa Nitrogen Cair

Fatiha Kamilah
fatihakamilah@apps.ipb.ac.id

Penggunaan nitrogen cair pada proses isolasi DNA bertujuan untuk memecah dinding sel tanaman dan mempermudah penghancuran jaringan, sehingga DNA dapat diekstraksi secara optimal. Namun, nitrogen cair sering kali sulit diperoleh, terutama di lokasi terpencil atau laboratorium dengan fasilitas terbatas. Oleh karena itu, pengembangan metode isolasi DNA yang tidak memerlukan nitrogen cair menjadi alternatif yang lebih praktis dan ekonomis. Metode ini dilakukan dengan memfiksasi jaringan daun menggunakan berbagai larutan fiksasi sebelum proses ekstraksi DNA genom menggunakan metode CTAB, tanpa melibatkan nitrogen cair. Daun dari delapan jenis tanaman obat dikumpulkan dari daerah Tonk (kebun tanaman obat). Tanaman yang digunakan meliputi *Azadirachta indica* (A. Juss.), *Ocimum sanctum* (Linn.), *Catharanthus roseus* (Linn.), *Chlorophytum borivilianum* (Sant. F), *Calotropis gigantea* (Linn.), *Syzygium cumini* (Linn.), *Zizyphus mauritiana* (Lam.), dan *Emblica officinalis* (Linn.). Daun-daun tersebut kemudian diberi beberapa perlakuan fiksasi untuk keperluan isolasi DNA genom.

Jaringan daun dicelupkan ke dalam larutan fiksasi selama 30 menit untuk mendenaturasi enzim, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (37°C) dan suhu -80°C. Larutan fiksasi yang digunakan meliputi alkohol absolut, campuran alkohol–kloroform (70:30), serta alkohol–EDTA 0,5 M (pH 8,0) dengan perbandingan 70:30, masing-masing sebanyak 5 ml per gram jaringan. Setelah proses fiksasi, jaringan daun dihomogenisasi menggunakan mortar dan alu. Beberapa modifikasi diterapkan pada metode CTAB, antara lain variasi konsentrasi polyvinyl pyrrolidone (PVP) sebesar 1,5%, 2,0%, dan 2,5%, serta penambahan tahap ekstraksi menggunakan kloroform–isoamil alkohol (24:1) untuk meningkatkan efisiensi penghilangan senyawa pengganggu seperti polifenol dan polisakarida. DNA yang diperoleh kemudian didilusi hingga 1000 kali menggunakan buffer Tris-EDTA (pH 8,0). Analisis kuantitatif DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm untuk DNA dan 280 nm untuk protein, dengan rasio A260/A280 digunakan sebagai indikator kemurnian DNA.

Untuk analisis kualitatif, DNA genom diamati menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8% yang diwarnai dengan ethidium bromide (EtBr). Selanjutnya, DNA genom digunakan dalam analisis RAPD-PCR menggunakan enam primer acak. Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 25 µl yang terdiri atas buffer Taq (2,5 µl), dNTP (2,5 mM), primer (10 ng), Taq DNA polimerase (1 U), dan DNA genom (25 ng). Produk PCR kemudian dipisahkan menggunakan gel agarosa 1,8% yang mengandung ethidium bromide. Selain itu, DNA genom juga direstriksi menggunakan enzim EcoRI sebanyak 3 U/µg DNA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam, kemudian dianalisis menggunakan gel agarosa 0,8% di bawah sinar UV. Hasil menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan fiksasi memberikan pengaruh terhadap kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Sebagai perbandingan, isolasi DNA menggunakan nitrogen cair juga dilakukan. Konsentrasi DNA yang diperoleh menggunakan nitrogen cair berada pada kisaran rasio A260/A280 sebesar 1,3, sedangkan penggunaan larutan fiksasi alternatif menghasilkan rasio antara 1,1 hingga 1,5. Secara umum, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan dalam kualitas maupun kuantitas DNA genom yang diisolasi baik menggunakan nitrogen cair maupun metode tanpa nitrogen cair.

Ketiga perlakuan fiksasi pada suhu ruang menghasilkan jumlah DNA yang relatif sebanding dan seluruh larutan fiksasi menunjukkan efisiensi yang serupa dalam proses isolasi DNA. Penambahan kloroform atau EDTA ke dalam alkohol tidak memberikan peningkatan hasil, bahkan cenderung menyulitkan proses penggerusan jaringan daun. Oleh karena itu, penggunaan alkohol

sebagai larutan fiksasi dianggap paling sesuai untuk percobaan lanjutan dan sebagai alternatif metode isolasi DNA tanpa nitrogen cair. DNA genom yang diperoleh menunjukkan berat molekul tinggi dan dapat diamplifikasi dengan baik menggunakan RAPD-PCR pada seluruh spesies tanaman yang diuji, seperti yang ditunjukkan pada *Azadirachta indica*. Meskipun pada beberapa spesies nilai rasio A260/A280 kurang dari 1,8 yang mengindikasikan adanya kontaminan, hal ini diduga berkaitan dengan perbedaan kandungan polisakarida, serat, dan senyawa anti-kualitas antarspesies tanaman. Secara keseluruhan, protokol ini memiliki keunggulan berupa prosedur yang sederhana, waktu isolasi yang lebih singkat, serta biaya yang lebih rendah dibandingkan metode konvensional yang menggunakan nitrogen cair.

Referensi

1. Sharma, P., Joshi, N., & Sharma, A. (2010). Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(6), 610–614.
2. Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012, Article 205049.
3. Quiñones, K. J. O., et al. (2024). Liquid-nitrogen-free CTAB DNA extraction method from silica-dried leaf samples (cost-effective approach for high-quality DNA). (Journal article on ScienceDirect).