



Komparasi Metode Ekstraksi DNA Menggunakan Daun Padi: Review

Ade Buchori^{1*}, Habibi Firmansah¹, Mutia Anika¹, Sri Ratnawati¹, Umi T Ulfa¹, Yuniel Zendrato¹

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura,
Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Corresponding Author: buchoriade@apps.ipb.ac.id

Info Artikel	Abstrak
Kata Kunci: Ekstraksi DNA, CTAB, Daun padi, Kit ekstraksi	Ekstraksi DNA berkualitas dari jaringan tanaman membutuhkan metode yang tepat dalam memurnikan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Isolasi DNA pada tanaman padi biasanya menggunakan bagian daun, namun membutuhkan pertimbangan dalam penggunaan metode tergantung kebutuhan, tujuan, dan memperhatikan kelebihan dan kekurangan dari setiap metode isolasi DNA. Artikel ini mengkaji metode isolasi DNA pada daun tanaman padi untuk mendapatkan DNA dengan kualitas baik menggunakan metode konvensional ataupun kit komersial. Perbandingan metode isolasi DNA daun padi dari lima peneliti menunjukkan bahwa metode Ahmadikhah (2009) memiliki keunggulan dibandingkan keempat metode lainnya. Ahmadikhah (2009) menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi, membutuhkan sampel yang sangat kecil (30 mg) dan dapat diaplikasikan pada sampel daun segar (muda) dan daun kering. Metode isolasi Ahmadikhah (2009) menunjukkan hasil visualisasi pola pita yang jelas tanpa adanya <i>smear</i> .
Diterima	
5 Desember 2023	
Disetujui:	
20 Desember 2023	

1. PENDAHULUAN

Isolasi Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) adalah suatu metode untuk memurnikan DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari suatu sampel yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya (Gupta 2019). Metode yang digunakan dalam isolasi DNA memiliki strategi yang berbeda-beda, namun pada dasarnya memiliki tiga tahapan utama yaitu lisis, separasi, dan presipitasi. Lisis merupakan tahapan pemecahan atau perusakan dinding sel dan membran sel tanaman yang bertujuan untuk mengeluarkan materi DNA di dalam sel. Separasi yakni memisahkan DNA dari residu-residu RNA dan protein yang masih tersisa. Presipitasi yakni mengendapkan kandungan DNA yang selanjutnya dilakukan pemurnian sampel DNA dengan meminimalkan kehilangan produk DNA selama proses berlangsung (Lever et al. 2015).

Ekstraksi DNA berkualitas baik dari jaringan tanaman merupakan tugas yang sulit dilakukan karena adanya polisakarida dan senyawa polifenol (Rezadoost et al. 2016). Hal ini disebabkan oleh kandungan senyawa sekunder yang diproduksi dalam sel tanaman berbeda-beda, maka setiap tanaman membutuhkan prosedur isolasi yang optimum agar diperoleh DNA genom yang baik. DNA berkualitas baik memiliki kemurnian dengan rasio A260/280 antara 1,8-2,0 dan kurangnya zat pengotor, seperti polisakarida dan polifenol (Abdel-latif 2017). Tingkat kemurnian, konsentrasi, dan kualitas produk DNA sangat ditentukan oleh metode isolasi DNA dan mempengaruhi analisis selanjutnya. Produk DNA tersebut dapat digunakan untuk elektroforesis, kloning sequencing, fingerprinting, Polymerase Chain

Reaction (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), SSR, ISSR, SNP, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), dan analisis molekuler lainnya (Nalini *et al.* 2003).

DNA yang diekstraksi dari daun dewasa dilaporkan memiliki tingkat kesulitan karena sering memiliki kualitas isolasi DNA yang buruk, hasil ini dipengaruhi oleh adanya konsentrasi tinggi polifenol, tanin, polisakarida dan metabolit sekunder lainnya (Varma *et al.* 2007). Sehingga dianjurkan menggunakan berbagai modifikasi dari teknik standar umumnya, seperti penambahan Polyvinylpyrrolidone (PVP) dan β -mercaptoethanol, ataupun penggunaan isopropanol untuk membantu menghancurkan jaringan serta penyimpanan lebih lama (seperti overnight) dari ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi (Syafaruddin *et al.* 2011). Isolasi DNA pada tanaman padi biasanya menggunakan bagian daun, sedangkan diketahui bahwa tanaman padi gogo memiliki kandungan polifenol tertinggi dibandingkan dengan padi sawah (Latiff *et al.* 2019). Namun tidak menutup kemungkinan pada padi sawah juga memiliki kandungan polifenol dan metabolit sekunder lainnya yang dapat mempengaruhi kualitas DNA.

Pertimbangan penggunaan metode tergantung kebutuhan dan tujuan dari isolasi DNA pada tanaman padi serta memperhatikan kelebihan dan kekurangan dari setiap metode tersebut. Pada metode konvensional, memiliki biaya yang lebih murah dan dapat digunakan dalam lingkup yang luas sementara kekurangannya peneliti perlu memodifikasi protokol atau memadukan dua atau lebih prosedur yang berbeda untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang diinginkan untuk kebutuhan tertentu (Varma *et al.* 2007), sehingga membutuhkan waktu relatif lebih lama (Nalini *et al.* 2003). Pada penggunaan kit komersial dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi kerja karena telah tersedia seperangkat perlengkapan isolasi DNA yang siap pakai, namun tentunya lebih mahal dibandingkan dengan metode konvensional, kekurangan lainnya peneliti harus menghitung dengan teliti kebutuhan sesuai dengan berapa banyak sampel dan konsentrasi DNA yang ingin diperoleh sehingga ke depannya tidak kekurangan bahan dan juga memastikan bahwa tanaman padi telah terdaftar dalam uji isolasi DNA dari kit komersial tersebut. Pada beberapa kondisi seperti, ratusan sampel DNA yang perlu dianalisis, jarak sampel tanaman dengan lokasi laboratorium, waktu kebutuhan data analisis, dan lain sebagainya juga menjadi salah satu pertimbangan menentukan metode isolasi DNA yang digunakan (Xu *et al.* 2005). Artikel ini mengkaji metode isolasi DNA pada daun tanaman padi untuk mendapatkan metode yang terbaik antara metode isolasi konvensional dan kit komersial untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik.

Faktor yang Mempengaruhi Perbedaan Metode Isolasi DNA

Secara umum terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi terjadinya perbedaan metode isolasi DNA, yaitu:

Jenis tanaman

Setiap tanaman memiliki ciri khas tertentu, seperti tanaman yang memiliki kadar selulosa yang tinggi, atau kadar polifenol yang tinggi, maupun pati yang tinggi. Hal ini berdampak kepada metode isolasi yang akan digunakan untuk memperoleh DNA yang diinginkan. Salah satu ciri khas tanaman ialah mempunyai dinding sel yang mana untuk memperoleh DNA tanaman, dinding sel harus dihancurkan terlebih dahulu. Secara umum, peneliti menggunakan senyawa cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) dalam proses melisiskan sel karena metode ini mudah dilakukan, biaya murah, cepat serta hasil isolasi DNA memiliki kemurnian dan konsentrasi yang baik, serta metode tersebut mampu mengatasi kandungan senyawa lain yang dapat menghambat tahap isolasi DNA (Doyle & Doyle 1987).

Organ tanaman

Jenis organ yang digunakan juga dapat mempengaruhi metode isolasi DNA. Salah satu contohnya organ umbi yang kaya pati dan polifenol. Metode yang sering digunakan dalam isolasi DNA umbi ialah CTAB yang ditambah PVP atau penambahan beta mercaptoethanol yang berfungsi untuk menghilangkan kandungan senyawa polifenol dalam sel tumbuhan (Cheng *et al.* 2003). Sedangkan

organ daun secara umum metode yang digunakan pada metode isolasi DNA adalah metode CTAB dan SDS (sodium dodecyl sulphate) terkadang juga ditambah mercaptoethanol (Ribeiro *et al.* 2007).

Umur dan Kandungan Organ

Umur organ merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi metode isolasi. Contoh jaringan daun muda yang memiliki tekstur yang lunak sehingga mempermudah dalam proses isolasi DNA. Sedangkan daun yang tua memiliki tekstur yang lebih keras hal ini dapat dikarenakan tumbuhan tua memiliki sel yang sudah terdiferensiasi dan terkadang memproduksi senyawa tertentu yang dapat menyulitkan proses isolasi DNA. Satu jenis tanaman dapat memiliki kandungan senyawa yang berbeda pada biji, akar, batang, daun, dan bunga. Sebagai contoh tanaman *Helianthus annuus* diketahui organ biji mengandung pati, glikosid, flavonoid, tannin, alkaloid, saponin, steroid, dan minyak murni (Subashini & Rakshita 2012). Bagian daun mengandung seskuterpen lakton, monoterpen, diterpen, alkaloid, dan fenol (Ceccarini *et al.* 2004). Sedangkan batang mengandung hemiselulosa, alkaloid, fenol, dan flavonoid (Javed 2011).

Dana

Jenis buffer ekstraksi sering dipengaruhi oleh jenis kandungan tanaman dan jumlah dana yang dibutuhkan peneliti. Peneliti yang memiliki dana yang memadai akan memilih menggunakan kit. Sedangkan peneliti yang memiliki dana yang minim lebih cenderung membuat buffer sendiri.

Referensi

Referensi yang dimaksud ialah tingkat kepercayaan dan kebiasaan dari peneliti. Jika ada publikasi menggunakan suatu metode yang isolasi DNA dengan hasil isolasi DNA bagus dan sesuai yang diharapkan, maka peneliti lebih cenderung menggunakan metode tersebut sebagai referensi isolasi DNA. Terlebih lagi jika memiliki kesamaan jenis tanaman atau tujuan penelitian.

Komparasi Metode Isolasi DNA Tanaman Padi

Terdapat lima hasil penelitian dari beberapa peneliti tanaman padi yang memberi beberapa referensi terkait metode isolasi DNA pada tanaman padi. Tiap-tiap peneliti memiliki metode dan tujuan isolasi DNA yang berbeda. Komparasi metode dari lima peneliti tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

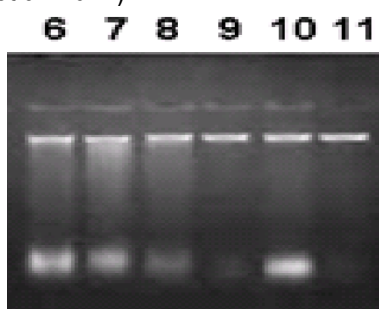
Tabel 1. Komparasi metode isolasi dari berbagai referensi

	Warsi <i>et al.</i> (2021)	Elfianis <i>et al.</i> (2021)	Wening <i>et al.</i> (2021)	Setiawan (2021)	Akhmadikhah (2009)
Jenis sampel	Daun segar	Daun segar	Daun segar	Daun segar	Daun tanaman kering dan segar
Metode	-	CTAB oleh Doyle (1987)	CTAB	<i>DNAeasy-kit</i> (Qiagen)	CTAB oleh Doyle (1987)
Keadaan tanaman	Tanaman (15 HST) hasil induksi stres	Tanaman normal	Tanaman normal	Tanaman normal	Tanaman normal: Daun segar (15 HST) Daun kering (tahap berbunga)

	Warsi <i>et al.</i> (2021)	Elfianis <i>et al.</i> (2021)	Wening <i>et al.</i> (2021)	Setiawan (2021)	Akhmadikhah (2009)
Jumlah sampel	0.5 g	0.05 g	-	20 mg	30 mg
Buffer	50mM Tris-HCl (pH-8.0), 500mM NaCl, 10mM EDTA (pH-8.0), 1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 1% β -Mercaptoethanol	CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 2% PVP-40 1, 2% Mercaptoethanol	-	Buffer AE (10 mM Tris·HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0)	Daun kering: 2% CTAB, 1.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, dan 20 mM EDTA pH 8.0 Daun segar : CTAB 1%, 700 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, dan 50 mM EDTA pH 8.0)
Uji kuantitatif DNA genom (A260/A280)	1.8-1.9 (baik)	-	-	1.82-2.15 (baik)	-
Visualisasi hasil isolasi	Pita terlihat jelas	-	-	<i>smear</i>	Pita terlihat jelas
Visualisasi hasil amplifikasi	Pita terlihat jelas	Pita terlihat jelas	Pita tidak terlalu jelas dan <i>smear</i>	Pita terlihat jelas	Pita terlihat jelas

Perbandingan Visualisasi Elektroforesis

Visualisasi hasil elektroforesis dari ekstraksi DNA dengan 50 mM Tris-HCl (pH-8.0), 500mM NaCl, 10mM EDTA (pH-8.0), 1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 1% β - Mercaptoethanol memperlihatkan pita yang jelas, hal ini menunjukkan konsentrasi DNA hasil isolasi cukup tinggi (Gambar 1). DNA yield dari daun segar menunjukkan kualitas yang baik yaitu mencapai 529 μ g/g. Kemurnian hasil ekstraksi DNA dengan modifikasi buffer ekstraksi menunjukkan hasil yang baik dengan rasio A260/A280 dari sampel yaitu pada rentang 1.8-1.9 (Warsi *et al.* 2011).



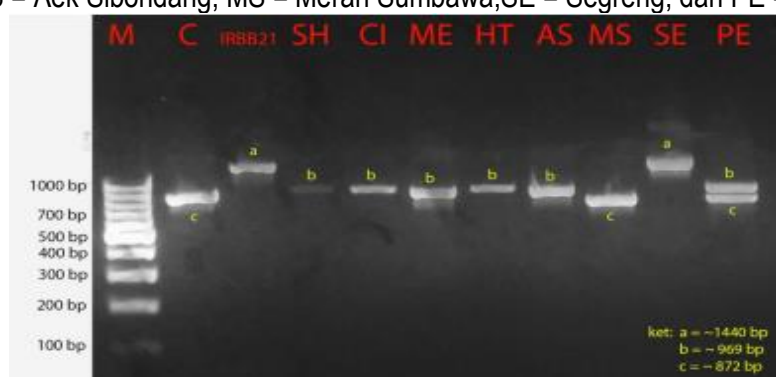
Gambar 1. Hasil ekstraksi DNA (Warsi *et al.* 2011)

Keterangan : 6-8 perlakuan *stress* kekeringan, 9-11 perlakuan *stress* salinitas



Gambar 2. Elektroforegram isolasi genom padi dengan Qiagen (Setiawan et al. 2021)

Keterangan: M = Marker 100 bp, C = Ciherang, SH = Sembada Hitam, CI= Cempo Ireng, ME = Melik, AS = Aek Sibondang, MS = Merah Sumbawa, SE = Segreng, dan PE = Pari Eja.



Gambar 3. Elektroforegram hasil amplifikasi gen Xa21

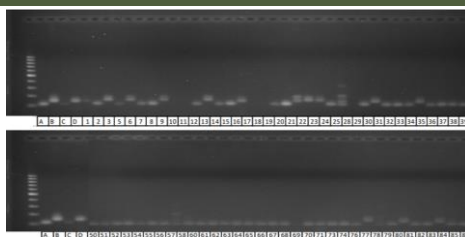
Keterangan: M = Marker 100 bp, C = Ciherang, SH = Sembada Hitam, CI= Cempo Ireng, ME = Melik, AS = Aek Sibondang, MS = Merah Sumbawa, SE = Segreng, dan PE = Pari Eja

Visualisasi pada marka RM228 (Gambar 4) dan marka RM248 (Gambar 5) tidak menunjukkan hasil yang terlalu baik sebab pita tidak terlalu jelas terlihat. Hasil amplifikasi pada marka RM328 (Gambar 6) menunjukkan adanya fragmen yang smear. Pita DNA antar sampel menunjukkan intensitas dan konsentrasi DNA sampel, sehingga pita DNA yang berbeda menunjukkan perbedaan konsentrasi dari DNA sampel (Wening et al. 2021). Hasil visualisasi pada marka RM228, RM 248, dan RM328 berturut-turut menunjukkan pita berukuran kurang lebih 100-300 bp, 100-200 bp, dan 100-400 bp.

Tabel 2. Pengukuran hasil isolasi DNA dengan Qiagen pada padi secara kuantitatif

Sampel DNA	Konsentrasi DNA(ng/μl)	Kemurnian DNA
		(A260/A280)
Ciherang	438,44	2,153
IRBB21	582,18	1,898
Sembada Hitam	404,04	2,010
Cempo Ireng	379,51	2,086
Melik	555,48	1,987
Hitam Toraja	463,57	2,054
Aek Sibondang	402,18	2,127
Merah Sumbawa	235,21	1,975
Segreng	378,93	1,980
Pari Eja	278,44	1,821

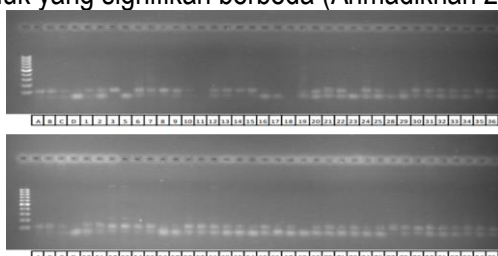
Sumber: Setiawan et al. (2021)



Gambar 4. Visualisasi RM228 pada analisis molekuler galur-galur padi (Isolasi dengan CTAB) (Wening et al. 2021)

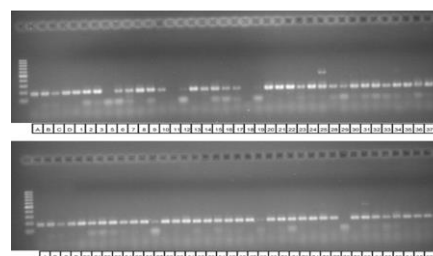
Keterangan: A = Inpari 30 Ciherang Sub1; B = IR42; C = Limboto; D = IR20; Angka 1, 2, 3, dan seterusnya menyatakan nomor galur; Ladder 1,000bp

Hasil elektroforesis pada agarose 1% menunjukkan pita DNA yang baik dan cukup jelas (Gambar 7). DNA yang telah disiapkan dengan dua metode ekstraksi yang berbeda diamplifikasi menggunakan primer yang berbeda yaitu RM171 dan RM1. Seluruh sampel menunjukkan hasil produk PCR yang jelas dan tajam (Gambar 8). Hasil PCR menunjukkan penggunaan kedua metode ekstraksi tidak menghasilkan produk yang signifikan berbeda (Ahmadikhah 2009).



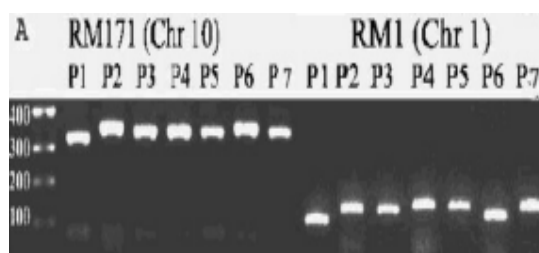
Gambar 5. Visualisasi RM248 pada analisis molekuler galur-galur padi (Isolasi dengan CTAB) (Wening et al. 2021)

Keterangan: A = Inpari 30 Ciherang Sub1; B = IR42; C = Limboto; D = IR20; Angka 1, 2, 3, dan seterusnya menyatakan nomor galur; Ladder 1,000bp

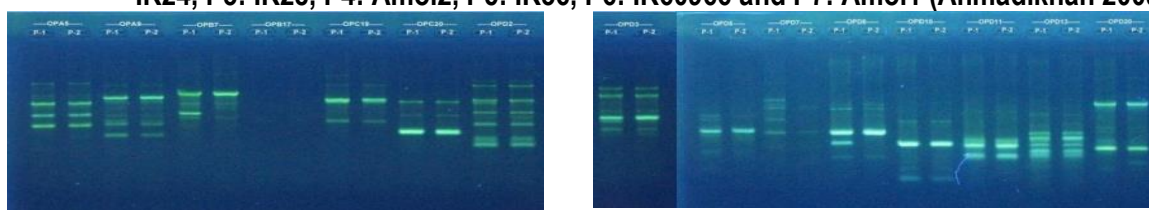


Gambar 6. Visualisasi RM328 pada analisis molekuler galur-galur padi (Isolasi dengan CTAB) (Wening et al. 2021)

Keterangan: A = Inpari 30 Ciherang Sub1; B = IR42; C = Limboto; D = IR20; Angka 1, 2, 3, dan seterusnya menyatakan nomor galur; Ladder 1,000bp



Gambar 8. Amplifikasi PCR dengan primer RM171 (kromosom 10) dan RM1 (kromosom 1) hasil ekstraksi dari protokol 1 (jalur 2-4) dan protokol 2 (jalur 5-8). P1: CMS Neda-A, P2: IR24, P3: IR28, P4: Amol2, P5: IR36, P6: IR60966 and P7: Amol1 (Ahmadikhah 2009)



Gambar 9. Hasil Amplifikasi DNA yaitu Primer OPA 5, OPA 9, OPB 7, OPB 17, OPC19, OPC 20, OPD 2, OPD 3, OPD 5, OPD 7, OPD 8, OPD 10, OPD 11, OPD 13, OPD 20 (Elfianis et al. 2021).

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB. Pita hasil amplifikasi terlihat dengan jelas (Gambar 9) (Elfianis et al. 2021).

Perbandingan Metode Isolasi DNA Tanaman Padi

Metode isolasi DNA yang dilakukan oleh Warsi et al. (2011) dengan menggunakan buffer 50 mM Tris-HCl (pH-8.0), 500mM NaCl, 10mM EDTA (pH-8.0), 1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 1% β -Mercaptoethanol) memperlihatkan pita yang jelas seperti yang terlihat pada Gambar 1. Metode ini lebih efisien dibandingkan dengan metode isolasi DNA lainnya dan lebih ekonomis dibandingkan dengan metode tradisional lainnya. Hasil dari penelitian Warsi et al. (2011) menjelaskan bahwa kualitas ekstraksi DNA dapat ditingkatkan dengan mengubah konsentrasi dari β -Mercaptoethanol dan NaCl pada buffer. Senyawa Polyphenols juga dapat dihilangkan dengan meningkatkan level dari β -Mercaptoethanol sehingga kemurnian DNA lebih baik setelah dimodifikasi dengan tingkat kemurnian DNA (A260/A280) berkisar pada 1.8 sampai 1.9. Penggunaan larutan β -Mercaptoethanol dalam proses ekstraksi berfungsi untuk mereduksi senyawa-senyawa fenolik pada DNA dengan dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan terpisah dengan DNA. Hal ini yang menyebabkan isolat DNA yang telah diisolasi bebas dari protein dan polyphenols.

Metode isolasi DNA yang dilakukan oleh Setiawan et al. (2021) menggunakan DNA easy-kit (Qiagen, Germany) pada 10 daun padi dengan genotipe yang berbeda menunjukan seluruh band yang relatif sama. Pita DNA genom padi pada seluruh sumur gel agarosa 0.8% mempunyai ukuran yang sama untuk seluruh kultivar padi. Namun hasil elektroforesis DNA menunjukkan beberapa pita yang kurang jelas (smear) seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Hal ini dapat disebabkan proses pemisahan dan pemurnian DNA masih kurang baik yang menyebabkan smear pada hasil elektroforesis. Hal ini menunjukkan masih terdapat pengotor seperti RNA yang dapat mengkontaminasi isolat DNA.

Pengukuran kemurnian DNA untuk menguji kemurnian seperti indikasi ada tidaknya kontaminan yang berupa RNA, senyawa organik, dan protein dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada rasio (A260/A280 dan A260/A230). Hasil ekstraksi pada kisaran 1.8 sampai 2.0 pada A260/A280 merupakan indikasi DNA dengan kemurnian yang tinggi dan tidak terkontaminasi residu protein. Hasil yang menunjukkan nilai kemurnian di bawah 1.8 menunjukan adanya kontaminan protein, sedangkan hasil ekstraksi dengan kemurnian di atas 2.0 menunjukan adanya kontaminan senyawa berat molekul kecil seperti RNA. Pada hasil penelitian Setiawan et al. (2021) uji kemurnian yang dilakukan hanya pada panjang gelombang A260/A280 yang terdapat pada Tabel 1 menunjukkan tingkat kemurnian DNA sampel berada pada kisaran 1.821 hingga 2.153 dan konsentrasi DNA yang didapatkan berkisar antara 235.21 ng/ μ l hingga 582.18 ng/ μ l. Tabel 1 menunjukkan 5 (lima) dari 10 (sepuluh) sampel DNA yang digunakan memiliki kemurnian DNA di atas 2.0.

Pada Gambar 3 menyajikan hasil amplifikasi DNA untuk mendeteksi gen Xa21 pada tiap kultivar padi dalam bentuk elektroforegram. Hasil isolasi DNA pada Gambar 3 menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan Gambar 2 dengan 3 kelompok ukuran band, yaitu ~1440 bp, ~969 bp, dan ~872 bp. Hal ini dikarenakan gen Xa21 di amplifikasi dengan menggunakan metode PCR (BioRad-T100 Thermal Cycler). Selain itu, produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% dibanding pada Gambar 2 yang menggunakan gel agarosa 0.8%. Dibandingkan dengan metode isolasi yang dilakukan oleh Warsi et al (2011), kontaminan isolat DNA pada hasil penelitian Setiawan et al (2021) menunjukkan kontaminan RNA sehingga hasil elektroforesisnya smear atau kurang jelas. Dalam hal ini, perlu dilakukan purifikasi dengan menggunakan RNase yang dalam hal ini menghilangkan kontaminan RNA. Setiawan et al (2021) menggunakan gel agarosa pada 0.8%. Dalam hal ini, konsentrasi gel agarosa yang digunakan dapat ditingkatkan lagi menjadi 1 sampai 1.2 % untuk mendapatkan visualisasi yang lebih baik. Walaupun demikian, hasil amplifikasi DNA untuk mendeteksi gen Xa21 menunjukkan hasil yang baik karena menggunakan metode PCR.

Metode isolasi DNA yang dilakukan oleh Wening et al. (2021) menggunakan metode CTAB pada sampel daun tanaman dengan empat marka molekuler SSR, yaitu marka RM164, RM228, RM248 dan RM328. Marka yang digunakan bertujuan untuk evaluasi toleransi galur-galur padi terhadap cekaman

kekeringan. Hasil analisis visual menunjukkan bahwa pada marka RM164 tidak diperoleh hasil yang baik sedangkan ketiga marka lainnya menunjukkan visualisasi yang baik (dalam penelitian tidak ditunjukkan hasil visual marka RM164). Walaupun demikian, visualisasi pada marka RM228 (Gambar 4) dan marka RM248 (Gambar 5) tidak menunjukkan hasil yang terlalu baik dikarenakan hasil pita tidak terlalu jelas terlihat. Begitu juga dengan hasil amplifikasi pada marka RM328 (Gambar 6) menunjukkan adanya fragmen yang smear. Beberapa fragmen yang smear pada marka RM228, RM248 dan RM328 ini menunjukkan beberapa genotipe tanaman padi tidak terdeteksi dengan sempurna oleh marka SSR yang digunakan. Beberapa metode yang dapat dilakukan untuk memperoleh pita yang baik seperti optimasi suhu annealing agar primer dapat menempel dengan baik, mendesain primer ulang, dan pemurnian DNA dengan penambahan RNase kembali.

Sama halnya dengan isolasi DNA yang dilakukan oleh Setiawan *et al* (2021), visualisasi hasil isolasi DNA yang dilakukan oleh Wening *et al* (2021) juga tidak begitu baik. Visualisasi menjadi kurang baik atau munculnya fragmen smear dapat diakibatkan oleh terpotongnya untaian DNA penyusun kromosom saat melakukan isolasi DNA. Pita DNA antar sampel yang terlihat pada gel agarosa menunjukkan intensitas dan konsentrasi DNA tiap sampel. Tinggi rendahnya konsentrasi DNA dapat dipengaruhi oleh senyawa yang terdapat pada tiap sampel, prosedur ekstraksi dan isolasi DNA, serta metode presipitasi DNA.

Metode isolasi yang dilakukan oleh Wening *et al* (2021) masih memiliki kekurangan dibandingkan dua metode isolasi yang dilakukan oleh Warsi *et al* (2011) dan Setiawan *et al* (2021). Visualisasi yang didapatkan masih kurang baik. Selain itu, Wening *et al* (2021) tidak melampirkan uji kuantitatif untuk mengukur kemurnian DNA. Pengujian kemurnian DNA dengan spektrofotometer atau nanofotometer dalam hal ini dapat mengkonfirmasi senyawa yang mengkontaminasi isolat DNA tersebut dengan kemurnian DNA yang baik berada pada rentang 1.8 sampai 2.0 pada rasio (A260/A280). Dengan mengetahui rentang kemurnian DNA dapat diharapkan mengkonfirmasi senyawa yang mengkontaminasi DNA. Penelitian Ahmadikhah (2009) menggunakan buffer isolasi DNA terhadap sampel daun kering (2% CTAB, 1.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, dan 20 mM EDTA pH 8.0) dan daun segar (1% CTAB, 700 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, and 50 mM EDTA pH 8.0) menampilkan visualisasi DNA genom dengan berat molekul yang tinggi (Gambar 7A). Penambahan enzim restriksi EcoRI dapat mencerna DNA genom dengan baik (Gambar 7B), sehingga dapat digunakan dalam analisis southern blot. Hasil amplifikasi (Gambar 8) pada kedua metode tersebut (P1-P3: sampel daun kering; P4-P7: sampel daun segar) menghasilkan pola pita yang jelas. Tingginya kualitas DNA yang dihasilkan tidak terlepas dari penggunaan buffer ekstraksi yang tepat.

Perbedaan komposisi buffer pada isolasi DNA dipengaruhi adanya oksidasi fenol lebih tinggi pada sampel daun kering yang dapat menyebabkan penurunan hasil dan kemurnian DNA. Senyawa fenolik dapat mengikat dan mengendapkan DNA sehingga menghasilkan pellet kecoklatan (Martida dan Parmawati 2019). Sehingga untuk memperoleh kualitas yang sama dalam isolasi DNA dengan menggunakan dua kondisi bahan tanaman berbeda maka Ahmadikhah (2009) memodifikasi komposisi buffer yang digunakan. Penambahan Tris-HCl pada larutan buffer berfungsi dalam mengubah sifat membran plasma dan membantu gangguan pada membran sel karena adanya interaksi lipopolisakarida yang ada di membran luar. Selain itu NaCl memiliki peranan dalam menetralkan muatan DNA dan membuat molekul menjadi kurang hidrofilik, yang berarti menjadi kurang larut dalam air. NaCl juga membantu menghilangkan protein yang terikat pada DNA dan menjaga agar protein tetap larut dalam air. Sedangkan peran EDTA merupakan chelating agent yang mengkelat ion Mg^{++} yang diperlukan untuk aktivitas DNase. Oleh karena itu, DNA tetap terlindungi dari enzim DNase, yang membutuhkan ion Mg^{++} untuk aktivitasnya (Kit dan Chandran 2010; Clark 1997).

Pada penelitian Elfianis *et al.* (2021) terkait isolasi DNA yang merujuk pada metode CTAB menurut Doyle dan Doyle (1987) dengan modifikasi, menunjukkan hasil amplifikasi dengan pola pita yang jelas dari 8 primer terpilih meliputi OPA-5, OPB-7, OPC-19, OPD-2, OPD-3, OPD-8, OPD-11, dan OPD-13 (Gambar 9). Berdasarkan hasil penelitian tersebut juga terdapat primer yang gagal diamplifikasi yaitu OPB-17. Hal ini menunjukkan tidak adanya kecocokan primer OPB-17 dengan urutan basa nitrogen pada

utas DNA yang diisolasi. CTAB banyak digunakan untuk mengganggu membran dan metode umum yang digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman sedangkan SDS digunakan untuk melarutkan membran dan digunakan dalam ekstraksi DNA bakteri, menghilangkan hambatan DNA dan histon.

Metode Ahmadikhah (2009) merupakan metode terbaik dari pada kelima metode lainnya karena dapat menghemat biaya dibandingkan metode lainnya dimana tidak memerlukan nitrogen cair (Warsi et al. 2011), kit ekstraksi DNA komersial yang mahal (Setiawan et al. 2021), atau presipitasi etanol untuk menghasilkan cetakan DNA untuk PCR. Selain itu, waktu yang dibutuhkan untuk metode ekstraksi DNA ini hanya kurang dari 60 menit (Doyle & Doyle, 1987; Steiner et al. 1995; Kang et al. 1998). Dengan prosedur ini, sampel yang sangat kecil diperlukan untuk ekstraksi DNA yang menyebabkan tidak ada limbah yang dihasilkan dari penggunaan nitrogen cair. Penggunaan konsentrasi komposisi buffer pada metode Ahmadikhah (2009) yang lebih kecil dibandingkan Elfianis et al. (2021) untuk sampel daun segar sudah menunjukkan hasil pola pita yang cukup jelas.

Keberhasilan ekstraksi DNA secara umum dipengaruhi oleh jenis tanaman, material yang digunakan (Ausubel et al. 1994), serta kandungan kimia yang terdapat pada jaringan tanaman tersebut (Pharmawati 2009). Dalam penelitian Ahmadikhah (2009) menunjukkan bahwa sampel tanaman padi segar (muda) maupun kering (tua) dapat menunjukkan kualitas hasil visualisasi yang sama dengan menggunakan buffer dan metode isolasi yang sesuai. Menurut Karsinah (2002) daun muda menghasilkan DNA lebih banyak dibandingkan dengan sampel dari daun tua. Hal ini karena daun muda tersusun dari sel-sel yang tumbuh aktif, belum banyak mengandung senyawa polifenol, dan senyawa metabolit sekunder lainnya, sehingga penggunaan komposisi bahan kimia dalam isolasi DNA untuk dapat mereduksi metabolit sekunder tersebut dapat lebih kecil dari pada sampel dari jaringan yang sudah tua. Hasil dari seluruh jurnal di komparasi seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Komparasi hasil dari berbagai metode isolasi DNA

	Warsi et al. (2021)	Elfianis et al. (2021)	Wening et al. (2021)	Setiawan (2021)	Akhmadikhah (2009)
Uji kuantitatif DNA genom (A260/A280)	1,8-1,9 (baik)	-	-	1,82-2,15 (baik)	-
Visualisasi hasil isolasi	Pita terlihat jelas	-	-	<i>smear</i>	Pita terlihat jelas
Visualisasi hasil amplifikasi	Pita terlihat jelas	Pita terlihat jelas	Pita tidak terlalu jelas	Pita terlihat jelas	Pita terlihat jelas

2. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan perbandingan kelima metode isolasi DNA, penggunaan metode Ahmadikhah (2009) lebih unggul dibandingkan keempat metode lainnya. Hasil amplifikasi Ahmadikhah (2009) sudah menunjukkan pola pita pada sampel segar dengan komposisi buffer yang lebih rendah dari pada Elfianis et al. (2021). Penggunaan sampel segar (muda) maupun kering (tua) pada penelitian Ahmadikhah (2009) dapat menghasilkan visualisasi pola pita dengan konsentrasi buffer dan metode isolasi DNA yang sesuai. Ahmadikhah (2009) tidak menggunakan kit ekstraksi DNA komersial yang mahal seperti pada Setiawan et al. (2021).

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Latif, A., Osman G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1):1-9.

- Ahmadikhah, A. (2009). A rapid mini-prep DNA extraction method in rice (*Oryza sativa*). *African Journal of Biotechnology*, 8(2):234-238.
- Ceccarini, L., Macchia, M., Flamini, G., Cioni, P.L., Caponi, C., Morelli, I. (2004). Essential oil composition of *Helianthus annuus* L. leaves, and heads of two cultivated hybrids “Carlos” and “Florom 350”. *Indust Crops Prod.* 19:13–7.
- Cheng, Y.J., Guo, W.W., Yi, H.L., Pang, X.M., Deng, X. (2003). An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 177a-177g.
- Clark, M.S. (1997). *Plant molecular biology – a laboratory manual*. New York: Springer–Verlag Berlin Heidelberg. Pp.305–328.
- Doyle, J.J, Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19 (1): 11-15.
- Elfianis, R., Warino, J., Rosmaina, R., Suherman, S., Zulfahmi. (2021). Analisis kekerabatan genetik tanaman padi (*Oryza sativa* L.) di Kabupaten Kampar dengan menggunakan penanda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Agroteknologi*, 11 (2): 75-84.
- Guillemaut, P., Maréchal-Drouard, L. (1992). Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 60-65.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2):116–117.
- Javed, K (2011). Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(16): 3149-3151.
- Karsinah, K., Sudarsono, S., Setyobudi, L., Aswidinnoor, H. (2002). Keragaman genetik plasma nuffah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 7(1): 8-16.
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol Rep.*, (17):1–7.
- Kit, Y.S., Chandran, S. (2010). A Simple, rapid and efficient method of isolating DNA from Chokanan mango (*Mangifera indica* L). *Afr J Biotechnol.*, 9(36):5805–5808.
- Latiff, N.A., Jabir, A.R., Din, M., Atiqah, S., Alam, Z., Hanapi, S.Z., Sarmidi, M.R. (2019). Quantification of polyphenol content, antioxidant properties and LC-MS/MS analysis in Malaysian indigenous rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Agr Natural Resource*, 53:402–409.
- Lever, M., Torti, A., Eikenbusch, A., Michaud, P., Šantl-Temkiv, A.B., Jørgensen, B.B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in microbiology*, 6:476.
- Martida, V., Pharmawati, M. (2019). Comparison of DNA yield from different plant materials of *Plumeria* sp. (Apocynaceae). *Journal of Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*, 3(1): 8-11.

- Nalini, E., Jawali, N., Bhagwat, S.G. (2003). A simple method for isolation of DNA from plants suitable for long term storage and DNA marker analysis. *Issue*. 249.
- Rezadoost, M.H., Kordrostami, M., Kumleh, H.H. (2016). An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech*. 6(1):61.
- Ribeiro, R.A., Lovato, M.B. (2007). Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res*. 6:173-187.
- Setiawan, A., Sebastian, A., Purwestri, Y.A. (2021). Deteksi gen ketahanan hawar daun bakteri Xa21 pada padi (*Oryza sativa* L.) hitam dan merah lokal di Indonesia. *Vegetalika*, 10(2):120-132
- Steiner, J.J., Poklemba, C.J., Fjellstrom, R.G., Elliott, L.F. (1995). A rapid onetube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res.*, 23: 2569-2570.
- Subashini, R., Rakshitha, S. (2012). Phytochemical screening, antimicrobial activity and in vitro antioxidant investigation of methanolic extract of seeds from *Helianthus annuus* L. *Chem Sci Rev Lett.*, 1: 30–34
- Syafaruddin, S., Randriani, E., Santoso, T.J. (2011). Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Buletin RISTR*, 2 (2).
- Varma, A., Padh, H., Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnol J.*, 2(3):386-392.
- Warsi, M.K., Jan, A.T., Azam, M., Wanwari, S., Mohd, Q., Haq, R. (2011). Efficient DNA isolation method for molecular studies from leaves and roots of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Phytology*, 3(2): 78-80
- Wening, R.H., Suwarno, W.B., Purwoko, B.S., Rumanti, I.A., Estiati, A. (2021). Konfirmasi toleransi galur-galur Padi terhadap cekaman kekeringan secara molekuler. *J. Agron Indonesia*, 49(2):105-111
- Xu, X., Kawasaki, S., Fujimura, T., Wang, C. (2005). A Protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 291–295.