



## **METODE EKSTRAKSI DNA TANAMAN TANPA PRESIPITASI ETANOL UNTUK KEGIATAN *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

### **A Simplified Plant DNA Extraction Protocol without Ethanol Precipitation for Polymerase Chain Reaction (PCR) Activities**

**Kristianto Nugroho\***, **Rerenstradika Tizar Terryana**, **Reflinur**, **Puji Lestari**

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian  
Jalan Tentara Pelajar 3A, Cimanggu, Bogor 16111

\*Email: [nugrohoxkristianto@gmail.com](mailto:nugrohoxkristianto@gmail.com)

#### **ABSTRACT**

*Molecular-based research in agriculture includes DNA extraction stage involving DNA precipitation using ethanol or isopropanol which tends to take a long time. The purpose of this study was to obtain a plant DNA extraction method for Polymerase Chain Reaction (PCR) activities without going through the ethanol precipitation stage. Five important agricultural commodity crops, namely rice, corn, soybeans, chilies, and shallots were extracted by DNA using the modified Doyle and Doyle method. After the extraction phase using chloroform and isoamil alcohol solvents, the supernatant obtained was not precipitated using ethanol but was directly diluted and used as a template in PCR activities using two pairs of Simple Sequence Repeat (SSR) markers. The results showed that all samples could be well amplified, and amplicon tape visualized in both 1% agarose gel and 6% polyacrylamide gel were clearly visible. This method could save time and material, and reduce the dependence on liquid nitrogen. But this method is still limited to PCR requirements only, and cannot be used for activities that require high quality and quantity of DNA such as Next Generation Sequencing (NGS), digestion, and hybridization.*

**Keywords:** DNA extraction, ethanol precipitation, liquid nitrogen, PCR, SSR,

#### **ABSTRAK**

Penelitian berbasis molekuler pada bidang pertanian mencakup tahapan ekstraksi DNA yang melibatkan presipitasi DNA menggunakan etanol atau isopropanol yang cenderung memakan waktu lama. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metode ekstraksi DNA tanaman untuk kegiatan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tanpa melalui tahapan presipitasi etanol. Lima tanaman komoditas pertanian penting yaitu padi, jagung, kedelai, cabai, dan bawang merah diekstraksi DNA-nya menggunakan metode *Doyle and Doyle* yang dimodifikasi. Setelah tahap ekstraksi menggunakan pelarut kloroform dan isoamil alkohol, supernatan yang terbentuk tidak dipresipitasi menggunakan etanol melainkan langsung diencerkan dan digunakan sebagai *template* dalam kegiatan PCR menggunakan dua pasang marka *Simple Sequence Repeat* (SSR). Hasil menunjukkan bahwa seluruh sampel dapat teramplifikasi dengan baik serta pita hasil amplicon yang tervisualisasi baik pada gel agarosa 1% maupun gel poliakrilamid 6% terlihat jelas. Metode ini dapat menghemat waktu dan bahan serta mengurangi ketergantungan pemakaian nitrogen cair. Tetapi metode ini masih terbatas hanya untuk kebutuhan PCR saja dan tidak dapat digunakan untuk kegiatan yang membutuhkan DNA dengan kualitas serta kuantitas tinggi seperti *Next Generation Sequencing* (NGS), digesti, maupun hibridisasi.

**Kata Kunci:** ekstraksi DNA, nitrogen cair, PCR, presipitasi etanol, SSR

## PENDAHULUAN

Dunia pertanian saat ini dihadapkan pada tuntutan untuk mampu menghasilkan varietas unggul yang tidak hanya berproduksi tinggi namun tahan terhadap cekaman abiotik seperti cuaca ekstrem maupun cekaman biotik seperti serangan hama dan penyakit. Kegiatan pemuliaan tanaman dalam rangka menghasilkan varietas unggul baru banyak dilakukan baik melalui persilangan buatan, introduksi, pemurnian varietas lokal, maupun mutasi (Asadi 2014). Keberhasilan suatu program pemuliaan sangat bergantung pada ketersediaan sumber daya genetik (SDG) yang dimiliki. Informasi mengenai karakter-karakter bernilai ekonomi dari SDG yang dimiliki dapat membantu program pemuliaan menjadi lebih terarah (Tasma 2015).

Selama ini karakterisasi SDG lebih banyak dilakukan secara morfologi, namun cara ini memiliki kelemahan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Nuraida 2012). Sebaliknya karakterisasi dengan memanfaatkan marka molekuler bersifat lebih akurat hingga level genom serta lebih efisien dalam membedakan SDG yang berkerabat dekat (Tasma et al. 2015). Menurut Furqoni et al. (2017), teknik *Polymerase Chain Reaction* banyak diaplikasikan dalam kegiatan karakterisasi molekuler karena teknik ini mampu menggandakan segmen DNA tertentu hingga jutaan kopi dalam waktu beberapa jam. *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Simple Sequence Repeat* (SSR), dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) merupakan marka-marka molekuler yang aplikasinya berbasis pada teknik PCR. SSR merupakan salah satu marka molekuler yang hingga saat ini banyak dimanfaatkan dalam kegiatan karakterisasi karena aplikasinya yang mudah, bersifat kodominan, serta tingkat polimorfisme tinggi (Ebrahimi et al. 2010).

Ekstraksi DNA merupakan kegiatan rutin yang dilakukan dalam penelitian berbasis molekuler (Pharmawati 2009; Ethica et al. 2013). Prinsip dasar ekstraksi DNA ialah bagaimana menghancurkan jaringan tanaman dan memperoleh DNA murni yang tidak terkontaminasi oleh komponen sel seperti protein dan karbohidrat, tanpa menyebabkan kerusakan pada DNA tersebut (Murtiyaningsih 2017). Menurut Amani et al.

(2011) kehadiran sejumlah kontaminan seperti polisakarida dan senyawa metabolit sekunder akan menghambat kerja enzim polimerase pada kegiatan PCR. Oleh karena itu proses penghilangan senyawa kontaminan tersebut mutlak diperlukan dalam suatu metode ekstraksi DNA.

Secara umum, ekstraksi DNA memiliki beberapa tahapan yaitu: 1) tahap penghancuran jaringan tanaman menggunakan nitrogen cair atau bufer ekstraksi, 2) tahap eliminasi senyawa kontaminan menggunakan pelarut organik seperti fenol, kloroform, dan isoamil alkohol, serta 3) tahap presipitasi DNA menggunakan etanol atau isopropanol. Tahapan tersebut cenderung memakan waktu khususnya pada saat inkubasi sampel selama tahap presipitasi. Saat ini sudah banyak kit ekstraksi DNA komersial yang beredar di pasaran, akan tetapi menurut perhitungan biaya ekstraksi per sampel menjadi lebih mahal (Ahmed et al. 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk memperoleh metode ekstraksi DNA yang relatif cepat dan biaya yang terjangkau. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode ekstraksi DNA tanaman yang dapat digunakan untuk kegiatan PCR tanpa melalui tahapan presipitasi etanol.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan lokasi penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga September 2018 di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian.

### Materi genetik

Sebanyak lima komoditas tanaman pertanian penting digunakan pada penelitian ini yang terdiri atas padi (*Oryza sativa* L.), jagung (*Zea mays* L.), kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.), cabai (*Capsicum annum* L.), dan bawang merah (*Allium cepa* var *ascalonium* L. (Back)). Setiap komoditas terdiri atas lima varietas seperti tercantum pada Tabel 1. Benih tanaman dari masing-masing varietas ditanam di rumah kaca menggunakan media campuran tanah dan sekam dengan perbandingan 1:1, kecuali bawang merah yang DNANYA diekstraksi langsung dari umbinya (Gambar 1). Selanjutnya daun yang

**Tabel 1.** Daftar varietas tanaman yang digunakan pada penelitian ini

No.	Tanaman	Varietas dan kode
1.	Padi	Code (P1) Ciherang (P2) Way Apoburu (P3) IR64 (P4) Situ Bagendit (P5)
2.	Jagung	Arjuna (J1) Gumirang (J2) Sadewa (J3) Sukmaraga (J4) Srikandi Kuning (J5)
3.	Kedelai	Anjasmoro (K1) Cikuray (K2) Grobogan (K3) Bromo (K4) Sindoro (K5)
4.	Cabai	Kencana (C1) Tanjung-2 (C2) Lembang-1 (C3) Lingga (C4) Ciko (C5)
5.	Bawang merah	Sembrani (B1) Kuning (B2) Mentes (B3) Bima (B4) Bali Karet (B5)

**Gambar 1.** Keragaan tanaman jagung yang digunakan pada penelitian ini

masih muda dari tanaman berumur satu bulan dipanen lalu disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga siap digunakan pada penelitian ini. Menurut Subpayakom et al. (2016), daun yang masih muda memiliki kandungan senyawa polisakarida, polifenol, serta metabolit sekunder yang lebih sedikit sehingga lebih memudahkan dalam kegiatan ekstraksi dibanding daun yang sudah dewasa.

### Bufekstraksi

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle and Doyle (1990) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan melalui penambahan 2% (w/v) PVP (*polyvinylpyrrolidone*), 0,4% (w/v) natrium disulfid, 1% (w/v) asam askorbat, dan B-merkaptotanol sebanyak 2  $\mu\text{L}$  per sampel. Bahan-bahan untuk pembuatan bufer ekstraksi terdiri atas 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, dan 2% (w/v) CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*). Bahan-bahan seperti PVP, natrium disulfid, dan asam askorbat baru ditambahkan pada bufer ekstraksi sesaat sebelum kegiatan ekstraksi DNA dilakukan dengan cara dicampurkan pada bufer lalu distirer pada pemanas bersuhu  $60^{\circ}\text{C}$  hingga larut. Setelah itu bufer ekstraksi didinginkan terlebih dahulu pada suhu ruang sebelum digunakan. Sementara itu penambahan senyawa  $\beta$ -merkaptotanol dilakukan di dalam lemari asam karena baunya yang menyengat serta sifatnya yang toksik.

### Metode ekstraksi dengan presipitasi

Sebanyak 0,5 g potongan daun atau umbi digerus pada cawan porselen menggunakan 500  $\mu\text{L}$  bufer ekstraksi, tanpa nitrogen cair. Hasil penggerusan kemudian dimasukkan dalam tabung mikro 2 mL, diikuti dengan penambahan kembali bufer ekstraksi hingga volumenya mencapai 1 mL. Selanjutnya dilakukan penambahan senyawa  $\beta$ -merkaptotanol sebanyak 2  $\mu\text{L}$  per sampel diikuti vortex selama 10 detik hingga sampel homogen. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Sampel dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung mikro setiap 5 menit. Selanjutnya sebanyak 800  $\mu\text{L}$  larutan kloroform : isoamil alkohol (24:1) ditambahkan pada masing-masing sampel, diikuti dengan vortex selama 15 detik. Sampel kemudian disentrifugasi

**Tabel 2.** Daftar marka SSR yang digunakan pada penelitian ini

No.	Tanaman	Marka	Sikuen (5'-3')	Referensi
1.	Padi	RM60	F: AGTCCCATGTTCCACTTCCG R: ATGGCTACTGCCTGTACTAC	Chen et al. (1997)
		RM474	F:AAGATGTACGGGTGGCATTTC R:TATGAGCTGGTGAGCAATGG	Kumar and Bhagwat (2012)
2.	Jagung	umc1069	F: AGAGAATCCCCAAGCAAACAAAC R: CTTTCATCGGAGCCATGGTGT	Andorf et al. (2015)
		umc1630	F: CAGACCTTCGAGGGCAAGAACT R: AGTTTTGGCTTCTTCTCCCAAGTC	Andorf et al. (2015)
3.	Kedelai	Satt009	F: CCAACTTGAAATTACTAGAGAAAT R: CTTACTAGCGTATTAACCCTTG	Cregan et al. (1999)
		Satt308	F: GCGTAAAGGTTGGCAGGGTGGAAAGTG R: GCGCAGCTTTATACAAAATCAACAA	Cregan et al. (1999)
4.	Cabai	EPMS441	F: GCACGAGGAAAGAGAGACATAG R: TCAACGGATTTCAGTCTTCCC	McGregor et al. (2011)
		CAMS390	F: CTGTTCTCCTCCCTCCCTCT R: TGAAGCAAGAACTGAACAATCA	McGregor et al. (2011)
5.	Bawang merah	ACE111	F: ACTTGGATGTAGAACTTCACAACATT R: TTGACCTAACAAATATAGTCCCACAAA	Tsukazaki et al. (2008)
		ACM154	F: CTTGTTTTGGCAGTTGGGAT R: CGATGAATACACCGATGACG	Kuhl et al. (2004)

pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C.

Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan secara hati-hati sebanyak 500 µL ke tabung mikro baru. Selanjutnya dilakukan penambahan 3M natrium asetat pH 5,2 sebanyak 1/10 kali volume supernatan diikuti penambahan isopropanol sebanyak satu kali volume supernatan (atau etanol absolut dua kali volume supernatan) diikuti inkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan selanjutnya dibuang sedangkan pelet yang terbentuk dicuci dengan 70% (v/v) etanol untuk menghilangkan sisa-sisa garam. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan kembali dibuang sedangkan pelet yang terbentuk dikeringanginkan semalam untuk menghilangkan sisa-sisa etanol. Pelet yang telah kering kemudian dilarutkan pada bufer 1× TE (10 mM Tris pH 8,0 dan 1 mM EDTA).

### Metode ekstraksi tanpa presipitasi

Sebanyak 0,5 g potongan daun atau umbi digerus pada cawan porselen menggunakan 500 µL bufer ekstraksi, tanpa nitrogen cair. Hasil penggerusan kemudian dimasukkan dalam tabung mikro 2 mL, diikuti dengan penambahan kembali bufer ekstraksi

hingga volumenya mencapai 1 mL. Selanjutnya dilakukan penambahan senyawa β-merkptoetanol sebanyak 2 µL per sampel diikuti vortex selama 10 detik hingga sampel homogen. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Sampel dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung mikro setiap 5 menit. Selanjutnya sebanyak 800 µL larutan kloroform : isoamil alkohol (24:1) ditambahkan pada masing-masing sampel, diikuti dengan vortex selama 15 detik. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan secara hati-hati sebanyak 500 µL ke tabung mikro baru dan selanjutnya dapat digunakan sebagai DNA *template* pada kegiatan PCR setelah diencerkan terlebih dahulu. Pengenceran dilakukan dengan faktor pengenceran 5 kali yaitu dengan cara mencampurkan 5 µL cairan supernatan dengan 95 µL ddH<sub>2</sub>O steril pada tabung mikro yang baru.

### Amplifikasi DNA

Tiap sampel diamplifikasi dalam total reaksi 10 µL mengandung DNA *template* sebanyak 1,5 µL; Kapa 2GFast ReadyMix (Kapa Biosystems, USA) sebanyak 5 µL; primer *Forward* dan *Reverse* dengan konsentrasi 10 µM masing-masing sebanyak 0,5 µL, dan ddH<sub>2</sub>O steril. Masing-masing sampel diamplifikasi menggunakan dua pasang

marka SSR yang berasal dari beberapa referensi seperti tercantum pada Tabel 2.

Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR T1 *Thermocycler* (Biometra, Germany) dengan profil PCR sebagai berikut: denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti oleh sebanyak 35 siklus proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* (tahap penempelan primer) pada suhu 52 atau 55°C selama 1 menit, dan *extension* (perpanjangan basa) pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan siklus *final extension* (tahap akhir perpanjangan basa) pada suhu 60°C selama 15 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1% untuk pengecekan awal pada tangki berisi 1× TAE dengan tegangan 90 V selama 30 menit dan dilanjutkan elektroforesis pada gel poliakrilamid 6% pada tangki berisi buffer 1× TBE dengan tegangan 80 V selama 90 menit untuk melihat separasi pita yang lebih jelas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA merupakan suatu perpaduan antara sains dengan seni karena begitu banyaknya faktor yang mempengaruhi. Hasil penelitian Ferniah dan Pujiyanto (2013) pada tanaman cabai menunjukkan bahwa terdapat tiga faktor utama yang mempengaruhi keberhasilan proses ekstraksi DNA yaitu kualitas jaringan tanaman yang digunakan, kuantitas jaringan tanaman, serta teknik penghancuran jaringan tersebut. Secara keseluruhan, komponen bufer ekstraksi telah mengandung sejumlah senyawa yang diperlukan untuk membantu melisis sel serta menjaga agar DNA tidak mengalami kerusakan. Adanya deterjen kationik seperti CTAB bermanfaat dalam mendegradasi dinding dan membran sel tanaman, sementara kehadiran garam seperti NaCl berperan dalam menciptakan kondisi hipertonic sehingga sel menjadi lebih mudah hancur (Almeida et al. 2017; Arfa et al. 2018). Kehadiran senyawa pengkelat yaitu EDTA berperan dalam mengikat kation bivalen seperti  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang dibutuhkan oleh enzim nuklease untuk mendegradasi DNA (Martinez 2017).

Namun demikian, setiap jaringan tanaman memiliki kandungan senyawa metabolit yang berbeda-beda sehingga modifikasi pada bufer ekstraksi perlu

dilakukan. Penambahan senyawa antioksidan seperti PVP, natrium disulfit, dan asam askorbat perlu dilakukan untuk meminimalisasi aktivitas senyawa polifenol yang seringkali membuat warna larutan menjadi kecoklatan (Kit dan Chandran 2010; Borse et al. 2011). Sementara itu kehadiran senyawa merkaptotetanol, selain membantu menghilangkan senyawa polifenol, juga membantu mendegradasi ikatan protein sehingga mudah terurai (Mornkham et al. 2012).

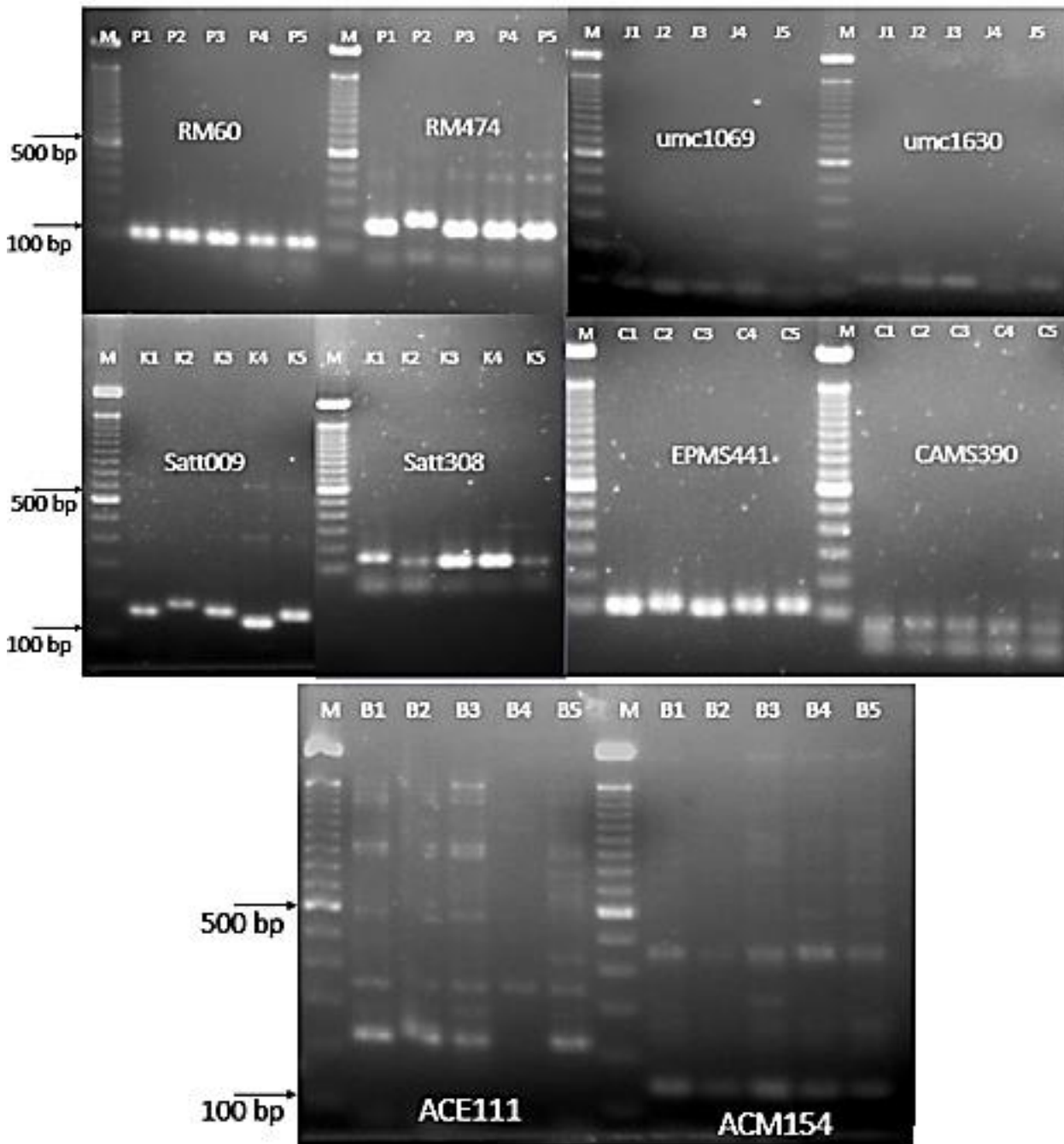
Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1% dari sampel yang diekstraksi pada penelitian ini menunjukkan pita ampikon yang terlihat jelas dan tidak menunjukkan adanya degradasi (*smear*) (Gambar 2). Seluruh sampel dapat teramplifikasi dengan baik menunjukkan bahwa senyawa kontaminan seperti polisakarida dan polifenol yang seringkali menghambat aktivitas PCR sudah tereliminasi, terutama pada sampel bawang merah yang berasal dari umbi. Kandungan polisakarida pada umbi bawang merah cukup tinggi yang diperlihatkan dengan terbentuknya lendir selama tahap penggerusan. Selain itu umbi bawang merah juga kaya akan senyawa metabolit seperti thiosulfonates, thiosulfonates, allicin, aliin, dan ajoene yang cukup tinggi (Gopal 2015). Menurut Moyo et al. (2008), senyawa polisakarida seringkali berikatan dengan DNA menghasilkan struktur yang kental seperti gel sehingga dapat menghambat kerja enzim polimerase. Namun demikian, seluruh sampel bawang merah yang diekstraksi menggunakan metode ini mampu teramplifikasi dengan baik. Elektroforesis pada gel agarose 1% berfungsi sebagai pengujian awal untuk melihat apakah DNA yang diperoleh dari metode ekstraksi pada penelitian ini dapat teramplifikasi atau tidak, karena gel agarosa 1% lebih murah dan mudah untuk diaplikasikan. Menurut Nugraha et al. (2014), gel agarosa memiliki kemampuan memisahkan fragmen DNA dari ukuran beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa. Hanya saja separasi pita ampikon yang dihasilkan gel agarosa kurang baik sehingga perlu dilanjutkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid.

Hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid 6% pun menunjukkan hal yang sama (Gambar 3). Pita ampikon terlihat jelas seluruhnya di bawah visualisasi UV sehingga dapat diskor dengan mudah untuk keperluan

analisis keragaman genetik atau sidik jari tanaman menggunakan marka SSR. Pada beberapa primer, terdapat sampel-sampel yang memiliki pita amplikon lebih dari satu. Hal ini menunjukkan adanya alel heterozigot yang terdeteksi pada sampel tersebut. Kemampuan suatu marka dalam mengidentifikasi adanya alel heterozigot pada sampel yang digunakan disebut sebagai heterozigositas. Menurut Pandin (2009), heterozigositas merupakan karakteristik penting suatu lokus yang

menentukan suatu individu bersifat heterozigot untuk lokus tertentu dalam suatu populasi. Semakin banyak alel heterozigot yang diperoleh menunjukkan semakin tinggi tingkat keragaman genetik pada sampel yang digunakan.

Pada metode ini tidak digunakan nitrogen cair untuk proses penggerusan. Nitrogen cair menurut Kamba dan Deb (2018) bermanfaat untuk mempermudah proses penghancuran jaringan tanaman serta suhu dinginnya menjaga agar DNA tidak



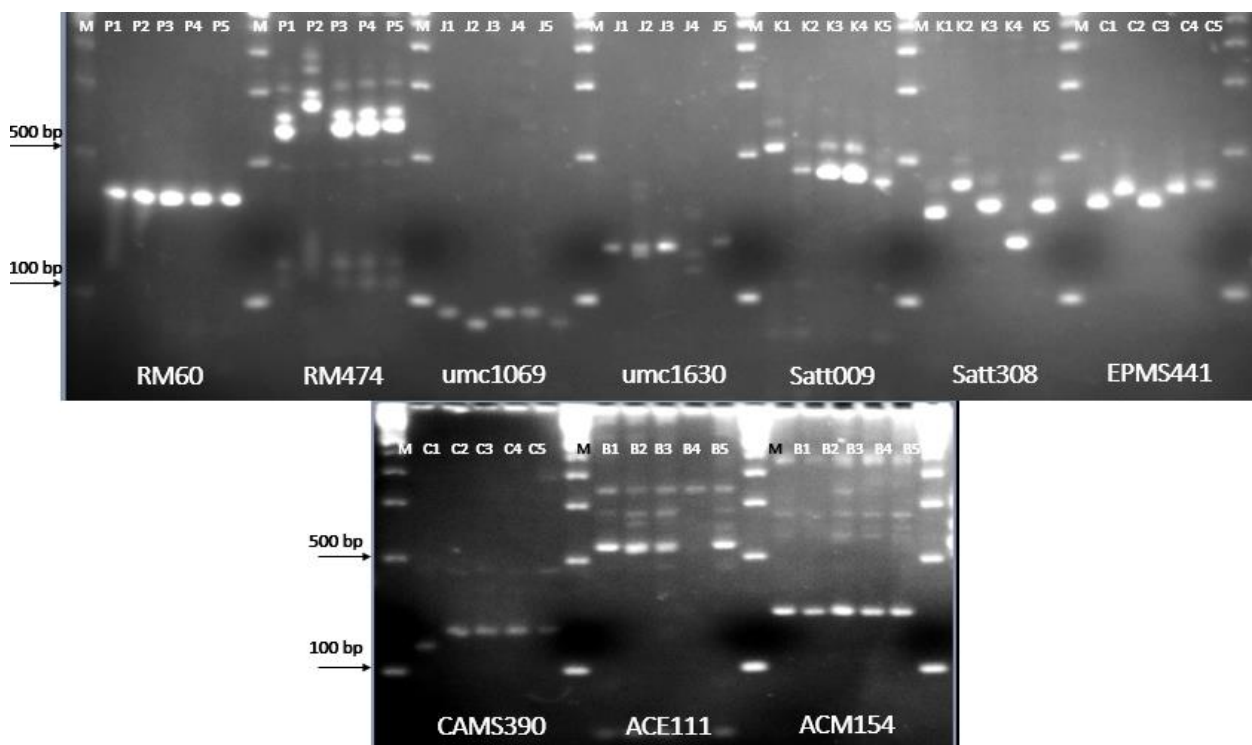
**Gambar 2.** Hasil elektroforesis sampel yang diamplifikasi menggunakan marka SSR pada gel agarose 1%. Keterangan: M: DNA ladder 100 bp; urutan dan kode sampel seperti tercantum pada Tabel 1

mengalami degradasi selama proses penghancuran tersebut. Akan tetapi nitrogen cair merupakan bahan yang memerlukan penyimpanan dan penanganan yang hati-hati serta tidak selalu tersedia khususnya di daerah yang jauh dari perkotaan. Sementara saat ini laboratorium yang bergerak di bidang biologi molekuler mulai banyak dirintis di luar Pulau Jawa sehingga penelitian mengenai metode ekstraksi DNA yang bersifat mudah dan murah sangat diperlukan.

Pada metode ini tahap presipitasi menggunakan etanol/isopropanol juga ditiadakan. Tahap tersebut umumnya berfungsi untuk menghilangkan polisakarida yang masih terbawa setelah proses ekstraksi kloroform-isoamil alkohol, melalui penambahan garam konsentrasi tinggi seperti natrium klorida, natrium asetat, atau ammonium asetat serta mengendapkan DNA melalui penambahan etanol atau isopropanol (Healey et al. 2014). Setelah itu sampel kemudian diinkubasi baik pada suhu ruang maupun suhu dingin untuk mengoptimalkan proses presipitasi. Tahap inkubasi tersebut lamanya bervariasi tergantung metode yang digunakan dan seringkali cukup memakan waktu, bahkan pada penelitian Michiels et al. (2003) diperoleh hasil bahwa presipitasi

semalaman (*overnight*) memberikan hasil konsentrasi DNA yang lebih tinggi.

Tahap tersebut jelas memakan waktu karena setelahnya sampel masih harus disentrifugasi untuk membentuk pelet, lalu pelet dicuci dengan 70% etanol, selanjutnya pelet harus dikeringkan sebelum dilarutkan menggunakan air atau TE bufer. Apabila DNA yang diekstraksi sebatas untuk keperluan PCR saja maka tahap presipitasi tersebut dapat dieliminasi seperti pada penelitian ini sehingga lebih menghemat waktu dan bahan. Menurut Bintang (2010), saat sampel disentrifugasi setelah penambahan larutan kloroform-isoamil alkohol, kontaminan seperti polisakarida dan protein akan mengendap di fase antara bersama debris sel sementara DNA akan berada di fase air (supernatan), sehingga supernatan yang dipindahkan pada tabung baru telah mengandung DNA dan telah terbebas dari kontaminan selama pemindahannya dilakukan secara hati-hati. Oleh karena itu supernatan tersebut dapat digunakan sebagai *template* dalam kegiatan PCR setelah diencerkan terlebih dahulu. Namun demikian, metode ekstraksi DNA tanpa presipitasi pada penelitian ini masih terbatas hanya untuk kebutuhan PCR saja dan tidak dapat digunakan untuk kegiatan



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis sampel yang diamplifikasi menggunakan marka SSR pada gel poliakrilamid 6%. Keterangan: M: DNA ladder 100 bp; urutan dan kode sampel seperti tercantum pada Tabel 1

yang membutuhkan DNA dengan kualitas serta kuantitas yang tinggi seperti *Next Generation Sequencing* (NGS), digesti, maupun hibridisasi. Masih perlu dilakukan penelitian lanjutan agar dapat diperoleh metode yang sederhana namun mampu memperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk kegiatan berbasis molekuler lainnya di samping PCR.

## KESIMPULAN

Metode ekstraksi DNA tanpa presipitasi etanol pada penelitian ini dapat digunakan untuk kegiatan molekuler seperti PCR. Seluruh sampel yang digunakan dapat teramplifikasi dengan baik serta pita hasil amplikon yang tervisualisasi pada gel agarosa 1% maupun gel poliakrilamid 6% terlihat jelas. Metode ini dapat menghemat waktu dan bahan serta mengurangi ketergantungan terhadap pemakaian nitrogen cair. Akan tetapi, metode ini masih terbatas hanya untuk kebutuhan PCR saja dan tidak dapat digunakan untuk kegiatan yang membutuhkan DNA dengan kualitas serta kuantitas yang tinggi seperti kegiatan *Next Generation Sequencing* (NGS), digesti, maupun hibridisasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Bank Gen Balitbangtan dan Balai Penelitian Tanaman Sayuran yang telah menyediakan materi genetik untuk kegiatan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmad W, Mirza B (2009) High-quality plant DNA extraction for PCR: An easy approach. *J Appl Genet* 50:105–107. doi: 10.1007/BF03195661

Almeida VM, Luz GA, Martins PP, Gomes MFC, Costa MF, Lima PSC, Valente SES (2017) Comparison of eight methods to isolate genomic DNA from *Hancornia speciosa*. *Genet Mol Res* 16:1-7. doi: 10.4238/gmr16039724

Amani J, Kazemi R, Abbasi AR, Salmanian AH (2011) A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for

Polymerase Chain Reaction analysis. *Iran J Biotechnol* 9:69-71

Andorf CM, Cannon EK, Portwood JL, Gardiner JM, Harper LC, Schaeffer ML, Braun BL, Campbell DA, Vinnakota AG, Sribalasu VV, Huerta M, Cho KT, Wimalanathan K, Richter JD, Mauch ED, Rao BS, Birkett SM, Sen TZ, Lawrence-Dill CJ (2015) MaizeGDB update: New tools, data, and interface for the maize model organism database. *Nucleic Acid Res* D1:44, D1195-D1201. doi: 10.1093/nar/gkv1007

Arfa NN, Daryono BS, Reflinur (2018) Comparison of detergent and CTAB method for isolation of DNA from Salak (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss, 'Pondoh'). *Biol Med Nat Product Chem* 7:15-20. doi: 10.14421/biomedich.2018.71.15-20

Asadi (2014) Pendayagunaan kedelai introduksi dalam perbaikan varietas. *Warta Biogen* 10:8-10

Bintang M (2010) *Biokimia Teknik Penelitian*. Penerbit Erlangga, Jakarta

Borse T, Joshi P, Chaphalkar S (2011) Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *J Plant Mol Biol Biotechnol* 2:1-7

Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 95:553-567. doi: 10.1007/s001220050596

Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, Van Toai TT, Lohnes DG, Chung J, Specht JE (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci* 39:1464-1490. doi: 10.2135/cropsci1999.3951464x

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15

Ebrahimi S, Sayed-Tabatabaei BE, Sharifnabi B (2010) Microsatellite isolation and characterization in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Iran J Biotechnol* 8:156-163

Ethica SN, Nataningtyas DR, Lestari P, Istini, Semiarti E, Widada J, Raharjo TR (2013) Comparative evaluation of



- conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indo J Chem* 13:248-253. doi: 10.22146/ijc.21284
- Ferniah RS, Pujiyanto S (2013) Optimasi isolasi DNA cabai (*Capsicum annuum* L.) berdasar perbedaan kualitas dan kuantitas daun serta teknik penggerusan. *BIOMA* 156:14-19. doi: 10.14710/bioma.15.1.14-19
- Furqoni AH, Yudianto A, Wardhani P (2017) Pengaruh rendaman air terhadap kualitas DNA pada sperma dengan STR-CODIS D13S317 dan D21S1. *J Biosains Pascasarjana* 19:41-54. doi: 10.20473/bsn.v19i1.4037
- Gopal J (2015) Onion research in India: Status and challenges. *Progressive Horticulture* 47:1-19. doi: 10.5958/2249-5258.2015.00001.9
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21. doi: 10.1186/1746-4811-10-21
- Kamba J, Deb CR (2018) A new simple and efficient DNA extraction protocol for orchid without liquid nitrogen and phenol. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol* 19:143-147. doi: 10.13140/RG.2.2.25464.34567
- Kit YS, Chandran S (2010) A simple, rapid and efficient method of isolating DNA from Chokanan mango (*Mangifera indica* L.). *Afr J Biotechnol* 9:5805-5808. doi: 10.5897/AJB10.007
- Kuhl JC, Cheung F, Yuan Q, Martin W, Zewdie Y, MaCallum J, Catanach A, Rutherford P, Sink KC, Jenderek M, Prince P, Town CD, Havey MJ (2004) A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *Plant Cell* 16:114-125. doi: 10.1105/tpc.017202
- Kumar V, Bhagwat SG (2012) Microsatellite (SSR) based assessment of genetic diversity among the semi-dwarf mutants of elite rice variety WL112. *Int J Plant Breed Genet* 6:195-205. doi: 10.3923/ijpb.2012.195.205
- Martinez J (2017) Rapid and simple method for the extraction of genomic DNA from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings. *Adv Res In Life Sci* 1:21-25. doi: 10.1515/arls-2017-0003
- McGregor C, Waters V, Nambeesan S, MacLean D, Candole BL, Conner P (2011) Genotypic and phenotypic variation among pepper accessions resistant to *Phytophthora capsici*. *Hortscience* 46:1235–1240. doi: 10.21273/HORTSCI.46.9.1235
- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Van Riet L, Van Laere A (2003) Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem* 315:85-89. doi: 10.1016/S0003-2697(02)00665-6
- Mornkham T, Wangsomnuk PP, Wangsomnuk P, Jogloy S, Pattanothai A, Fu YB (2012) Comparison of five DNA extraction methods for molecular analysis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Genet Mol Res* 11:572-581. doi: 10.4238/2012.March.8.5
- Moyo M, Amoo SO, Bairu MW, Finnie JF, Staden JV (2008) Optimising DNA isolation for medicinal plants. *S Afr J Bot* 74:771-775. doi: 10.1016/j.sajb.2008.07.001
- Murtiyaningsih H (2017) Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). *Agritrop* 15:83-93. doi: 10.32528/agr.v15i1.795
- Nugraha F, Roslim DI, Ardilla YP, Herman (2014) Analisis sebagian sekuen gen Ferritin2 pada padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika* 6:94-103. doi: 10.15294/biosaintifika.v6i2.3102
- Nuraida D (2012) Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *EI-Hayah* 2:97-103. doi: 10.18860/elha.v2i2.2210
- Pandin DS (2009) Depresi silang dalam kelapa dalam Mapanget berdasarkan penanda mikrosatelit (SSR). *Buletin Palma* 37:127-137
- Pharmawati M (2009) Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteaceae). *J Biologi* 13:12-16
- Subpayakom N, Poeaim A, Vanijajiva O, Poeaim S (2016) An efficient protocol for genomic DNA extraction from santol (*Sandoricum koetjape*) for SRAP

- marker analysis. *Int J Agric Technol* 12:1473-1480
- Tasma IM (2015) Pemanfaatan teknologi sekuensing genom untuk mempercepat program pemuliaan tanaman. *J Litbang Pert* 34:159-168. doi: 10.21082/jp3.v34n4.2015.p159-168
- Tasma IM, Satyawan D, Rijzaani H (2015) Genomic library construction, resequencing, and SNP identification based on whole-genome sequences of Indonesian soybean genotypes. *J AgroBiogen* 11:7-16
- Tsukazaki H, Yamashita K, Yaguchi S, Masuzaki S, Fukuoka H, Yonemaru J, Kanamori J, Kono I, Hang TTH, Shigyo M, Kojima A, Wako T (2008) Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*). *Theor Appl Genet* 117:1213-1223. doi: 10.1007/s00122-008-0849-5