

PEMILIHAN BAGIAN TANAMAN KAPAS *Gossypium hirsutum* SEBAGAI BAHAN UNTUK ISOLASI DNA

Dede Nuraida

Jurusan Pendidikan Biologi Universitas PGRI Ronggolawe Tuban

Email: dede.nuraida@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian pada bidang molekuler saat ini telah banyak dilakukan untuk berbagai keperluan. Langkah awal yang sangat menentukan dalam keberhasilan penelitian molekuler yang berbasis pada DNA adalah kualitas DNA yang diperoleh dari tahapan isolasi. Tiga langkah utama dalam isolasi DNA adalah perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa, protein, dan senyawa lainnya, serta pemurnian DNA. Isolasi DNA genom dari tanaman kapas (*Gossypium hirsutum*) cukup sulit dilakukan karena kandungan yang tinggi dari senyawa-senyawa polisakarida, kuinon, fenol, tannin, dan senyawa lainnya. *Co-presipitasi* dari senyawa-senyawa tersebut dapat menghasilkan kualitas dan kuantitas DNA yang rendah sehingga tidak dapat diaplikasikan untuk keperluan penelitian molekuler. Kandungan senyawa-senyawa tersebut tidak sama pada setiap bagian tanaman. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan bagian tanaman kapas yang dapat menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dari hasil isolasi. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan metode CTAB. Bagian tanaman kapas yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji dan daun tanaman yang berumur tiga minggu. Untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 0,8% dan untuk memvisualisasikannya dilakukan pewarnaan etidium bromide lalu difoto dengan menggunakan *gel doc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diantara biji dan daun tanaman kapas yang dijadikan sebagai bahan untuk isolasi DNA, daun kapas dapat menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik, ditandai dengan pita DNA yang bersih dan jelas. Sedangkan DNA yang diisolasi dari biji tidak menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik yang ditandai oleh pita DNA yang kotor dan kabur/*smear*.

Kata Kunci: isolasi DNA, biji, daun, pita DNA

PENDAHULUAN

Latar Belakang Masalah

Penelitian pada bidang molekuler saat ini telah banyak dilakukan untuk berbagai keperluan. Teknik biologi molekuler telah memberikan peluang untuk mengembangkan dan mengidentifikasi peta genetik dari suatu kultivar tanaman. Pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan penanda DNA telah berhasil membentuk penanda molekuler yang mampu dalam mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, evaluasi keragaman dan evolusi pada tingkat genetik.

Langkah awal yang sangat menentukan dalam keberhasilan penelitian molekuler yang berbasis pada DNA adalah kualitas DNA yang diperoleh dari tahapan isolasi. Kemurnian dan kualitas DNA yang diperoleh dari tahap ini akan sangat menentukan dalam penelitian-penelitian biologi molekuler. Tiga langkah utama dalam isolasi DNA adalah perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

Tanaman kapas merupakan tanaman yang memiliki kandungan senyawa metabolit yang tinggi, diantaranya adalah kandungan senyawa gosipol yang merupakan senyawa polifenol (Scheffler dan Romano, 2008). Senyawa tersebut tersimpan dalam kelenjar-kelenjar pigmen yang tersebar pada seluruh bagian tanaman (Scheffler dan Romano, 2008; Bell, dkk., 1978; Xue dan Liu, 2006; Cheng, dkk., 2003). Kehadiran metabolit-metabolit seperti fenol dan kontaminan lain seperti polisakarida, tanin dan senyawa lainnya dapat menurunkan kualitas dan kemurnian DNA. *Co-presipitasi* senyawa-senyawa tersebut menyebabkan rendahnya kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi (Abd-Elsalam, 2006; Paterson, 1993). Senyawa polifenol akan mengalami oksidasi dan terikat secara kovalen dengan protein dan asam nukleat, keberadaan senyawa-senyawa tersebut menyebabkan DNA hasil isolasi tidak dapat diaplikasikan untuk keperluan penelitian molekuler, misalnya DNA tidak dapat diamplifikasi pada reaksi PCR, atau juga DNA tidak peka terhadap enzim restriksi (Li, dkk., 2001).

Kandungan senyawa-senyawa seperti fenol ataupun senyawa lainnya bervariasi pada setiap bagian tanaman. Oleh karena itu pemilihan bagian tanaman yang tepat untuk isolasi DNA akan sangat menentukan dalam proses isolasi, sehingga diperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik yang dapat diaplikasikan dalam penelitian-penelitian molekuler.

Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan di atas, dirumuskan permasalahan sebagai berikut: Diantara biji, dan daun tanaman kapas, bagian manakah yang dapat menghasilkan kualitas DNA yang baik dalam proses isolasi DNA?



Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mencari bagian manakah dari tanaman kapas yang tepat untuk dijadikan bahan untuk isolasi DNA genom kapas, sehingga diperoleh DNA genom kapas dengan kualitas dan kuantitas yang baik, yang dapat diaplikasikan untuk keperluan penelitian-penelitian molekuler.

Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat diperoleh bagian tanaman yang tepat untuk dijadikan sebagai bahan dalam proses isolasi DNA, sehingga diperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Hal ini sangat penting sebagai langkah awal dalam melakukan penelitian-penelitian molekuler khususnya pada tanaman kapas *Gossypium hirsutum*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah: (1) biji kapas, diperoleh dari BALITTAS Malang, (2) daun kapas yang berumur 3 minggu (diperoleh dengan cara mengecambahkan biji kapas pada media kompos, pasir dan tanah dengan perbandingan 1:1:1), (3) buffer ekstrak untuk metode CTAB (Glukosa 1 M, PVP, Tris HCl 2 M, EDTA 0,5 M, dH₂O, Na Bisulfit), (4) buffer lisis (CTAB 5%, PVP, Tris HCl 2 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, dH₂O), (5) buffer ekstrak untuk metode SDS (EDTA 0,34 M, Tris HCl 2 M, NaCl 5 M, SDS dingin 10%, dH₂O), (6) Kloroform (7) isoamil alcohol (8) etanol absolute (9) natrium asetat (10) TE buffer (11) nitrogen cair, (12) bromophenol blue, (13) etidium bromida, (14) parafilm, (15) agarose 0,8%, (16) sarung tangan, (17) tip.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah (1) bak tanam plastik, (2) mortal dan martil, (3) tube, (4) sentrifugal, (5) vortex, (6) inkubator, (7) timbangan analitik, (8) alat elektroforesis horizontal, (9) micropipette, (10) tray untuk mencetak gel, (11) shaker, (12) gel document.

Prosedur Penelitian

Isolasi DNA dari daun kapas diawali dengan melakukan perkecambahan yang dilakukan di Lab Biologi UNIROW Tuban. Perkecambahan dilakukan dengan menanam biji kapas pada bak tanam plastik yang sudah berisi media yang terdiri dari kompos, pasir, dan tanah dengan perbandingan 1:1:1. Daun tanaman yang sudah berumur tiga minggu dijadikan bahan untuk isolasi DNA genom kapas (Azmat dan Khan, 2010).

Isolasi DNA dari bahan biji diawali dengan mengupas kulit biji, setelah kulit bijinya dibuang bahan tersebut diperlakukan dengan mengikuti prosedur isolasi. Prosedur isolasi yang digunakan baik pada daun maupun pada biji adalah dengan mengacu pada metode Iqbal (1997), yaitu dengan menggunakan buffer CTAB. Tahap isolasi DNA dilakukan di laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang.

Prosedur isolasi DNA dengan buffer CTAB adalah sebagai berikut: Bahan digerus dengan penambahan nitrogen cair, sampai menjadi serbuk halus. Serbuk selanjutnya dimasukkan ke dalam tube yang sudah berisi 80 µl buffer ekstrak dengan pH 7,5. Sampel selanjutnya diinkubasi dalam lemari es selama 5 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4^oC selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan 500 µl buffer lisis dengan pH 8 kemudian divortek. Selanjutnya Sampel diinkubasi pada suhu 65^oC selama 30 menit, setiap 10 menit diketuk-ketuk. Sampel ditambah dengan chloroform dan isoamil (24:1) sebanyak 500 µl, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dalam suhu 4^oC selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tube baru lalu ditambahkan 800 µl etanol absolut dan 80 µl natrium asetat lalu dibolak balik. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dalam suhu 4^oC selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan 800 µl etanol 70 % lalu disentrifugasi. Supernatan dibuang, pellet dikeringanginkan selama 24 jam, selanjutnya ditambahkan 30 µl TE.

Analisis Data

Kualitas DNA yang diperoleh dari hasil isolasi dari daun dan biji kapas, diamati dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 0,8 % (Ali *et al*, 2009; Rahman *et al*, 2002). Proses elektroforesis dilakukan dengan mencampurkan 3 µl DNA hasil isolasi dengan 1,5 µl Bromophenol blue lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur elektroforesis. Proses elektroforesis dilakukan dengan kecepatan 50 volt selama 50 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan pewarnaan dengan ethidium bromide untuk memvisualisasi pita-pita DNA yang dihasilkan. Proses pewarnaan dilakukan dengan cara merendam agarose (hasil

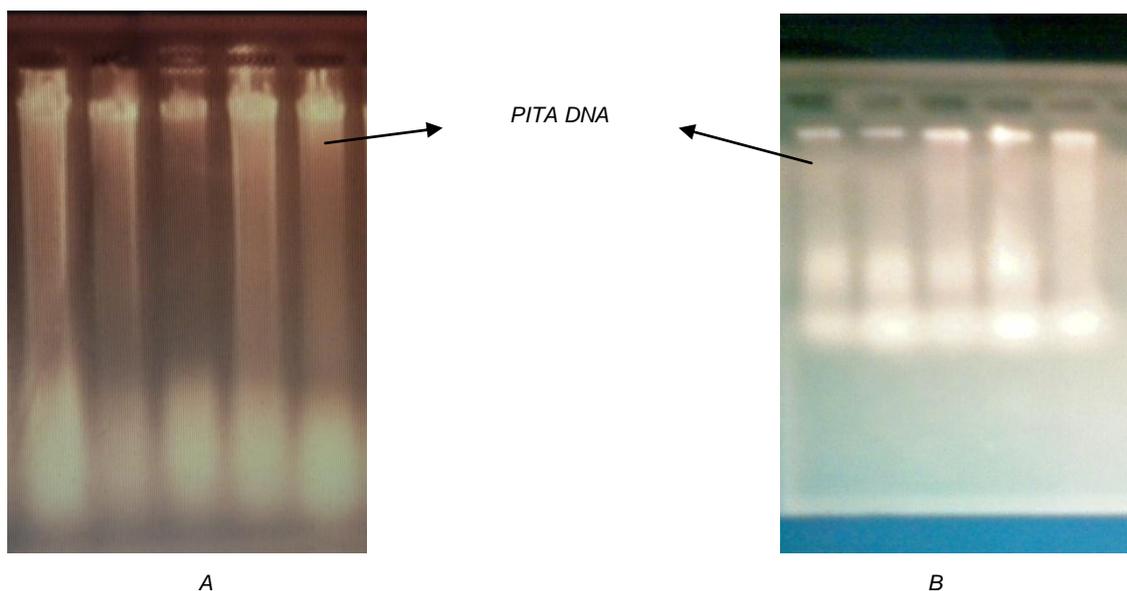


elektroforesis) dalam ethidium bromida 50% sambil dikocok dalam shaker selama 20 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA diamati dan difoto dengan menggunakan *gel documentation system*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Langkah awal isolasi DNA dari daun dimulai dengan melakukan perkecambahan pada media yang terdiri dari kompos, tanah, dan pasir dengan perbandingan 1:1:1. Benih yang ditanam pada media tersebut mulai berkecambah pada hari ke 4. Daun yang digunakan untuk isolasi DNA adalah daun yang sudah berumur 3 minggu. Hasil isolasi DNA dari biji dan daun dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa pita DNA yang diperoleh dari hasil isolasi daun menghasilkan pita DNA yang jelas dan bersih, hal ini berarti bahwa kualitas DNA yang dihasilkan dari isolasi daun memiliki kualitas yang baik. Sedangkan pita DNA yang diperoleh dari hasil isolasi biji sangat kotor dan *smear*, hal ini berarti bahwa DNA yang diperoleh dari isolasi biji kualitasnya kurang baik dan tidak memungkinkan untuk dapat diaplikasikan pada penelitian-penelitian molekuler.



Gambar 1: Hasil isolasi DNA genom Kapas; A. Dari bahan biji ; B. Dari bahan daun

DNA yang diperoleh dari isolasi dengan bahan biji sangat kotor dan *smear*, hal ini berarti bahwa metabolit-metabolit yang terkandung di dalam biji tidak dapat dibersihkan secara sempurna pada proses isolasi, sehingga tidak diperoleh DNA yang murni. Sedangkan pada daun proses pemurniaan DNA dapat terjadi lebih sempurna sehingga dapat diperoleh DNA yang murni, hal ini ditandai dengan pita DNA yang jelas dan bersih. Menurut Peccia dan Hernandez (2006) bahwa pada dasarnya prinsip dari isolasi DNA terdiri dari melisiskan sel dan memurnikan asam nukleat (DNA). Lisis merupakan perusakan dinding dan melepaskan DNA, hal ini bisa dilakukan dengan cara fisik maupun kimia. Pemurniaan DNA merupakan proses untuk memisahkan DNA dari lisat sel (protein, karbohidrat, lipid) dan kontaminan lain.

Menurut Paterson *et al.* (1993); Elsalam *et al.* (2007) bahwa ekstraksi DNA genom kapas cukup sulit dilakukan karena kandungan yang tinggi dari senyawa-senyawa polisakarida, kuinon, fenol, tanin dan senyawa-senyawa pengganggu lainnya. *Co-presipitasi* dari senyawa-senyawa tersebut dapat menghasilkan kualitas dan kuantitas DNA yang rendah, hal ini terjadi karena fenol akan teroksidasi dan terikat dengan protein dan asam nukleat selama tahap isolasi tersebut. Keadaan ini akan menyebabkan DNA yang diperoleh dari hasil isolasi tersebut tidak dapat diaplikasikan untuk keperluan-keperluan penelitian pada bidang molekuler.

Kandungan senyawa fenol pada tanaman kapas berbeda pada setiap bagian tanaman. Sebagai contoh, gosipol merupakan pigmen utama pada tanaman kapas merupakan senyawa fenol yang terdapat pada biji, akar, batang, dan daun (Cheng *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 1978; Xue & Liu, 2006). Kandungan gosipol tersebut terutama terdapat paling banyak pada biji (Margalith, 1967). Kandungan gosipol pada bagian yang terlindung dari cahaya seperti pada embrio biji mencapai 90-95%. Sedangkan pada jaringan yang berwarna hijau seperti daun mengandung gosipol hanya sekitar 10-30% (Bell *et al.*, 1978). Tingginya senyawa gosipol



sebagai senyawa fenol utama yang terdapat pada bagian biji juga telah dilaporkan oleh Nuraida (2007) yang telah memperoleh senyawa gossipol sebesar 25,75 µg/g BK pada biji, 8,00 µg/g BK pada akar, dan 1,05 µg/g BK pada daun.

Selain kandungan senyawa fenol, kandungan lipid/minyak pada biji kapas juga sangat tinggi sehingga menyulitkan proses isolasi. Seperti dikemukakan oleh Yarosh dan Megorskaya (1975) bahwa biji kapas mengandung lipid/minyak yang sangat tinggi, bisa mencapai 50% dari berat kering. Kandungan senyawa fenol, lipid, dan juga senyawa lainnya yang tinggi, pada bagian biji dibandingkan dengan bagian daun, menyebabkan sulitnya memperoleh DNA yang murni dari biji pada saat proses isolasi. Sebaliknya kandungan metabolit yang rendah pada bagian daun menyebabkan isolasi lebih mudah dilakukan, sehingga dapat diperoleh DNA dengan kualitas yang baik (Gambar 1).

SIMPULAN DAN SARAN

1. Simpulan

Hasil penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa, diantara biji dan daun tanaman kapas yang dijadikan sebagai sumber untuk isolasi DNA dengan menggunakan metode CTAB, bagian daun menghasilkan pita DNA yang lebih jelas dan bersih dibandingkan dengan bagian biji. Ini berarti bahwa isolasi DNA dengan metode CTAB pada bahan daun dapat menghasilkan kualitas yang lebih baik dari pada biji.

2. Saran

Bagian tanaman yang dijadikan sebagai bahan untuk isolasi DNA sangat menentukan keberhasilan dari proses isolasi, sehingga mempengaruhi kualitas DNA yang diperoleh. Oleh karena itu untuk melakukan isolasi DNA tersebut perlu mempertimbangkan dan memilih bagian tanaman yang tepat, agar diperoleh DNA dengan kualitas yang baik sehingga dapat diaplikasikan untuk keperluan penelitian molekuler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada Bapak Dr. Moh. Amin, M.Si., Bapak Dr. Ir. Aris Winaya, M.M.M.Si. dan Ibu Dr. Ir. Maftuchah, M.P., yang telah banyak memberikan masukan kepada penulis dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, F., Ashraf, M., Rehman, M.U., Zafar, Y., Asif, M., Kausar, A., Riaz, S., Niaz, M., Wahid, A., dan Abbas, S.Q. (2009). Development of Genetic Linkage Map of Leaf Red Colour in Cotton (*Gossypium hirsutum*) Using DNA Markers. *Pak. J. Bot.* 41 (3): 1127-1136.
- Azmat, M.B., dan Khan, A.L. (2010). Assesment of Genetic Diversity Among The Varieteies of *Gossypium arboreum* and *Gossypium hirsutum* Through Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Pak. J.Bot.* 42 (5): 3173-3181.
- Bell, A.A., Stivanovic, R.D., O'Brien, D.H. & Fryxell, P.A. (1978). Sesquiterpenoid aldehyde quinines and derivates in pigment glands of *Gossypium*. *Phytochemistry*. 17: 1297-1305.
- Cheng, J. S., Lo, Y.K., Yeh, J. H., cheng, H.H., Liu, C.P., Chen, W.C., dan Jan, C.R. (2003). Effect of Gossypol on Intracellular Ca²⁺ Regulation in Human Hepatoma Cells. *Chinese Journal of Physiology*. 46 (3): 117-122.
- Elsalam, K.A., Amal, A.A., dan samawaty, A.M.A.E. (2007). Isolation of High-Quality DNA from Cotton and its Fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and protection*. 114 (3):113-116.
- Iqbal, M.J., Aziz, N., Seed, A., Zafar, Y., dan Malik, K.A. (1997). Genetic Diversity Evaluation of Some Elite Cotton Varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 94:139-144.
- Li, H., Luo, J., Hemphill, J.K., Wang, J.T., dan Gould, J.H. (2001). Rapid and High Yielding DNA Miniprep for Cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Molecular Biology reporter*.19:1-5.
- Margalith, P. (1967). Inhibitory Effect of Gossypol on Microorganism. *Applied Microbiology*. 15(4): 952-953.
- Nuraida, D. (2007). *Analisis Kandungan Gossipol pada Biji, Akar, dan Daun Tanaman Kapas Gossypium hirsutum Cv. Kanesia 12*. Laporan Penelitian Dosen Muda.
- Paterson, A.H., Brubaker, C.L., dan Wendel, J.F. (1993). A Rapid Method for Extraction of Cotton (*Gossypium* spp.) Genomic DNA Suitable for RFLP or PCR Analysis. *Plant Molecular Biology reporter*. 11 (2):122-127.
- Peccia, J. dan Hernandez, M. (2006). Incorporating Polymerase Chain Reaction-Based identification Population Characterization, and Quantification of Microorganisms into Aerosol: A Review. *Atmospheric Environment*. 40: 3941-3961.
- Rahman, M.U., Malik, T.A., Aslam, N., Asif, M., dan Ahmad, R. (2002). Optimazion of PCR Conditions to Amplify Microsatellite in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genomic DNA. *Int.J. Agri.Biol.* 4 (2):282-284.
- Scheffler, J.A., dan Romano, G.B. 2008. Modifying Gossypol in Cotton (*Gossypium hirsutum*): A Cost Effective Method for Small Seed Samples. *The journal of Cotton Science* 12:202-209.



- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- Xue, B.C., dan Liu, E.B. 2006. Determination of Gossypol in Trace level by Flow Injection Analysis with Chemiluminescence Detection. *Chinese Chemical Letters*. 17 (1): 57-60.
- Yarosh, N.P., dan O.M. Megorskaya. 1975. Fatty Acid Composition of Free and Bound Lipids of Poppy Seeds. *Maslo.Zhir.Promst.* 7:10-12.

DISKUSI

Penanya: Sulistiono (Prodi Pendidikan Biologi UNP Kediri)

Apakah pertimbangan yang digunakan sehingga menggunakan sample untuk pemurnian DNA adalah daun dan biji dari pohon kapas? Selain itu mengapa tidak menggunakan bagian lain dari tanaman kapas, seperti akar, bila dilihat dari jenis protein yang terekskresi akar jauh lebih sedikit dari pada daun karena daun terdapat klorofil? Dan bagian mana pada biji yang digunakan untuk diisolasi (lebih spesifiknya, apakah embrionya, endospermanya, selaput bijinya ataukah bagian yang lainnya)?

Jawab:

Dalam teknik isolasi yang menjadi pertimbangan bagian mana yang diambil merupakan terletak pada masalah teknik. Pertimbangannya yaitu bila menggunakan daun, maka akan lebih mudah digerus, dan kandungan metabolit fenol terutama gossypol pada daun lebih sedikit sehingga mempermudah dalam pemurnian DNA nya. Selain itu dari pengalaman pemakalah sebelumnya dalam mendapatkan daun muda tanaman kapas agak kesulitan karena pemakalah mendapatkan dari balitbank sehingga harus menumbuhkan sendiri, tetapi setelah menumbuhkan sendiri ada beberapa varietas yang tidak dapat tumbuh maupun berkecambah. Oleh karena itu pemakalah memiliki pemikiran untuk menggunakan biji, meskipun dalam penelitian juga agak terasa sulit karena mengingat kandungan lemaknya yang tinggi dan metabolitnya juga tinggi dibandingkan dengan bagian yang lain. Untuk bagian biji yang digunakan adalah biji yang sudah dikupas kulitnya.

Feed back

Bila biji tersebut dikupas kulitnya, maka itu bukan lagi biji?

Saran moderator (Yudi Rinanto – Pendidikan Biologi FKIP UNS)

Perlu disampaikan dalam penelitian dalam bentuk asumsi tentang penggunaan istilah biji. Indikator Kemurnian DNA menggunakan profil gel elektroforesis dianggap juga masih terlalu kasar, karena masih banyak variabel pembatasnya. Sebenarnya ada indikator lain yang dapat digunakan yaitu memakai konsentrasi DNA nya.

