

Analisis Konsentrasi serta Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi Rumput Raja (*Pennisetum purpureoides*) dan Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum*) Menggunakan Metode CTAB dan DNAzol

Dity Asa Priyastomo¹, Nena Hilmia¹, Estria Furry Pramudyaswari², Romi Zamhir Islami¹

¹Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, ²Balai besar Padi Sukamandi Subang
Corresponding author: nena.hilmia@unpad.ac.id

ABSTRAK

Seiring dengan berkembangnya sektor peternakan, permintaan terhadap tumbuhan pakan pun ikut meningkat. Diperlukan upaya perbaikan genetik melalui teknik konvensional maupun melalui bioteknologi yang saat ini sudah berkembang pada tingkat molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan dari ekstraksi DNA pada rumput raja (*Pennisetum purpureoides*) dan rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) menggunakan dua buffer ekstraksi DNA yaitu CTAB dan Kit DNAzol. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Peubah yang diamati adalah konsentrasi dan kemurnian DNA. Data yang dihasilkan dianalisa menggunakan analisis statistik deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan ekstraksi DNA rumput raja dan rumput gajah yang dengan metode CTAB dan DNAzol mendapatkan hasil yang bervariasi. Ekstraksi DNA pada rumput raja dengan CTAB menghasilkan rata-rata konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi, yaitu sebesar 729,63 ng/ μ l dan 1,92, dibandingkan dengan menggunakan buffer DNAzol, dengan rata-rata konsentrasi DNA sebesar 142,72 ng/ μ l dan 1,61. Selanjutnya ekstraksi DNA rumput gajah menggunakan buffer DNAzol menghasilkan rata-rata konsentrasi dan kemurnian DNA yang lebih baik, yaitu 242,1625 ng/ μ l dan 1,83, dibandingkan menggunakan Metode CTAB, yaitu sebesar 44,8 ng/ μ l dan 3,05. Hasil ekstraksi DNA pada rumput raja menunjukkan buffer CTAB lebih baik sementara rumput gajah menggunakan buffer DNAzol relatif lebih tinggi dan lebih murni jika dibandingkan dengan buffer CTAB

Kata kunci : ekstraksi DNA, rumput gajah, rumput raja, CTAB, buffer DNAzol

Analysis of Concentration and Purity of DNA Extraction on King Grass (*Pennisetum purpureoides*) and Elephant Grass (*Pennisetum purpureum*)

ABSTRACT

In line with the development of the livestock sector, the forage demand increases. Genetic improvements are needed through conventional techniques or through biotechnology which is currently developing at the molecular level. This study was conducted to determine the concentration and purity of DNA produced from king grass (*Pennisetum purpureoides*) and elephant grass (*Pennisetum purpureum*) using two DNA extraction buffers, namely CTAB and Kit DNAzol. This research used descriptive method. The observed variables were concentration and purity of DNA. The data were analyzed using descriptive statistical analysis. The results showed average concentration of king grass DNA using CTAB buffer and DNAzol buffer were 729.63 ng/ μ l and 142.72 ng/ μ l, respectively, and the average purity were 1.92 and 1.61. The average concentration of elephant grass DNA using CTAB buffer and DNAzol buffer were 44.8 ng/ μ l and 242.1625 ng/ μ l, respectively, and the purity were 3.05 and 1.8325. DNA extraction of king grass and elephant grass using the CTAB and DNAzol methods got varying results, the DNA extraction from king grass showed a better concentration and purity using CTAB buffer while elephant grass using DNAzol buffer.

Keywords : DNA extraction, elephant grass, king grass, CTAB, DNAzol buffer

PENDAHULUAN

Hijauan sebagai pakan ternak ruminansia sangat penting karena menjadi pakan utama yang diberikan untuk ternak. Penyediaan hijauan yang baik hanya

dapat ditunjang dengan produksi hijauan yang baik. Tersedianya hijauan berkualitas akan menunjang pemeliharaan ternak ruminansia karena dengan tersedianya hijauan yang berkualitas maka pertumbuhan dari ternak itu sendiri akan baik sehingga dapat

menentukan keberhasilan suatu usaha peternakan.

Rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) adalah rumput bernutrisi cukup baik dengan palatabilitas yang baik, berukuran besar, dan memiliki produktivitas tinggi yang biasanya dipakai sebagai pakan ternak seperti sapi, kambing, dan domba. Rumput gajah banyak dibudidayakan karena ketahanannya terhadap cuaca panas. Rumput gajah termasuk tanaman tahunan, membentuk rumpun yang terdiri dari 20-50 batang dengan diameter lebih kurang 2,3 cm. Tumbuh tegak dan lebat, batang diliputi perisai daun yang berbulu dan perakaran dalam. Tinggi batang dapat mencapai 2-3 m, lebar daun 1,25-2,50 cm serta panjang 60-90 cm (Vanis, 2007). Rumput raja adalah tanaman tahunan (*perennial*), tumbuh tegak dan membentuk rumpun, serta berbatang tebal dan juga keras. Rumput ini dapat beradaptasi di daerah tropis relatif tahan kering, tidak tahan terhadap genangan air, sehingga perlu drainase yang baik.

Tanaman rumput raja dan rumput gajah merupakan sedikit dari banyaknya jenis tanaman yang dapat dijadikan sebagai pakan ternak yang memiliki kandungan nutrisi dan produktivitas yang cukup baik. Seiring dengan berkembangnya sektor peternakan, permintaan terhadap tumbuhan pakan pun ikut meningkat. Upaya untuk memenuhi permintaan tanaman pakan ternak ini dapat dilakukan dengan meningkatkan produktivitasnya. Peningkatan produktivitas dapat dilakukan melalui perbaikan genetik yang bersifat permanen dan perbaikan lingkungan yang mendukung pertumbuhannya. Upaya perbaikan genetik dapat dilakukan melalui teknik konvensional maupun melalui bioteknologi yang saat ini sudah berkembang pada tingkat molekuler.

Langkah awal pada penelitian molekuler adalah ekstraksi DNA, sebagai bahan dasar dalam penelitian molekuler. Kuantitas (konsentrasi) dan kualitas (kemurnian) DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi merupakan syarat mendasar yang harus terpenuhi dalam studi molekuler, terutama dalam penandaan sidik jari DNA. Kedua komponen tersebut juga akan mempengaruhi hasil amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Terdapat beberapa metoda untuk mengisolasi DNA dari sel tanaman, salah satunya adalah *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) dan menggunakan Kit DNA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan dari ekstraksi tanaman rumput raja (*Pennisetum purpureoides*) dan rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) dengan metode CTAB dan Kit DNAzol.

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan yang digunakan berupa rumput raja (umur 3 minggu setelah tanam/mst) sebanyak 8 sampel, rumput gajah (umur 3 mst) sebanyak 8 sampel, yang diambil dari laboratorium hijauan makanan ternak Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, DNAzol, *wash buffer* (*wb*) DNAzol, CTAB *buffer*, β -merkaptotanol, kloroform: isoamil alkohol (*cia*), isopropanol 100%, ethanol 100%, ethanol 70%, dd-h₂o, dan *rnase*.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya sarung tangan karet, gunting, penggaris, tube 1,5 ml, tube 2 ml, *tissue lyser*, *vortex*, spatula, *sentrifugator*, mikro pipet, mikro tips pipet, lemari pendingin, *beads*, *micromixer*, dan nanodrop spektrofotometer. Penelitian dilaksanakan pada 4 Januari sampai 28 Januari 2021, di Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Kecamatan Ciasem Kabupaten Subang.

Metode

Penelitian ini menggunakan 2 metode ekstraksi DNA yaitu metode kit DNAzol yang dikembangkan oleh *Molecular Research Center Inc.* dan metode CTAB IRR (*International Rice Research Institute*) yang telah dimodifikasi. Modifikasi metode CTAB yang dilakukan adalah: 1) Pemanasan *buffer* CTAB yang ditambah β -merkaptotanol pada suhu 52°C selama 90 menit, bertujuan untuk optimasi kerja *buffer* CTAB dalam mendenaturasi lemak, protein, polisakarida, dan senyawa fenolik; 2) Menginkubasi sampel dalam oven bersuhu 52°C selama 180 menit bertujuan untuk mempercepat proses lisis dinding sel; dan 3) Menginkubasi sampel setelah penambahan isopropanol dingin pada suhu -20°C selama 180 menit bertujuan untuk optimasi kerja isopropanol dalam mempresipitasi DNA.

Peubah yang diamati

Peubah yang diamati pada penelitian ini yaitu konsentrasi dan kemurnian DNA. Konsentrasi DNA dihitung dengan cara meneteskan 2 μ l larutan DNA sampel pada alat nanodrop spektrofotometer yang terhubung dengan komputer. Nanodrop spektrofotometer akan membaca konsentrasi DNA dengan satuan ng/ μ l. DNA diukur pada panjang gelombang 260 nm, sementara protein diukur pada panjang gelombang 280 nm.

Pengukuran kemurniaan larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan OD₂₆₀ nm dengan OD₂₈₀ nm untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA dan protein. Secara matematis cara

menghitung kemurniaan yaitu:

$$\text{Kemurniaan DNA} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

Keterangan:

OD₂₆₀ : nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm.

OD₂₈₀ : nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian mengenai analisis konsentrasi dan kemurnian DNA pada rumput raja disajikan pada Tabel 1 dan rumput gajah disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rumput Raja

No	Kode sampel	CTAB		DNAzol	
		Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA
1	RR1	-	-	167,6	1,76
2	RR2	419,4	1,98	50,75	1,83
3	RR3	-	-	95,75	1,81
4	RR4	1775,2	1,95	180,45	1,33
5	RR5	164,4	1,85	2,43	1,30
6	RR6	169,55	1,78	309,85	1,77
7	RR7	893,35	2,21	163,4	1,38
8	RR8	955,85	1,76	171,5	1,69
	Rata-rata	729,63	1,92	142,72	1,61
	Simpangan Baku	616,541	0,167	93,79	0,23

Tabel 2. Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rumput Gajah

No	Kode sampel	CTAB		DNAzol	
		Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA
1	RG1	-	-	87,95	1,71
2	RG2	44,8	3,05	253,55	1,74
3	RG3	-	-	191,5	1,99
4	RG4	-	-	140,95	2,04
5	RG5	-	-	462,3	1,83
6	RG6	-	-	160,9	1,75
7	RG7	-	-	454	1,78
8	RG8	-	-	186,15	1,82
	Rata-rata	44,8	3,05	242,1625	1,8325
	Simpangan Baku	0	0	141,32	0,12

Menurut Varma *et al.* (2007) terdapat sejumlah faktor yang menentukan keberhasilan ekstraksi DNA, antara lain pemilihan jenis jaringan dan umur jaringan yang digunakan, perlakuan dan penyimpanan jaringan sebelum diisolasi, dan perlakuan pada homogenasi jaringan, terutama pada jaringan tumbuhan yang dinding selnya memiliki banyak senyawa polisakarida. Menurut Syafaruddin dan Santoso (2011) terdapat tiga faktor penting dalam proses ekstraksi

dan purifikasi DNA secara optimal antara lain: (1) proses penghomogenan jaringan tanaman, (2) komposisi larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan (3) penghilangan senyawa polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan.

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat nilai rata-rata konsentrasi DNA rumput raja dengan menggunakan metode kit DNAzol yaitu 142,72 ng/ μ l dengan rata-rata kemurniannya yaitu 1,61. Menurut Sambrook dan Russel (1989), DNA dapat dikatakan murni apabila mempunyai nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm berkisar antara 1,8-2,0 dan konsentrasi untai ganda DNA murni pada nilai absorban OD₂₆₀ = 1 adalah 50 ng/ μ l. Nilai rata-rata konsentrasi DNA rumput raja menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi yaitu 729,63 ng/ μ l dengan rata-rata kemurniannya yaitu 1,92. Nilai rata-rata konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan sudah memenuhi standar konsentrasi dan kemurnian DNA yang dapat dikatakan baik dan juga murni. Menurut Yulia *et al.* (2016) rendahnya persentase keberhasilan kemurnian ini dikarenakan masih adanya hasil rasio kemurnian DNA yang memiliki nilai lebih rendah dari 1,8. Nilai tersebut menunjukkan bahwa masih adanya kontaminasi protein pada sampel DNA. Menurut Fatchiyah (2009) DNA yang tidak murni dapat disebabkan oleh adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna. Faktor lain yang menyebabkan DNA tidak murni adalah adanya sisa kandungan metabolit sekunder pada bagian tanaman yang diekstrak.

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat nilai rata-rata konsentrasi DNA rumput gajah yang menggunakan metode kit DNAzol yaitu 242,1625 ng/ μ l dengan rata-rata kemurniannya yaitu 1,83. Nilai rata-rata konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkannya sudah baik. Hasil ekstraksi DNA dengan kedua metode ini bervariasi karena masih terdapat sampel yang memiliki nilai kemurnian di bawah dan di atas standar. Menurut Yulia *et al.* (2016) rendahnya persentase keberhasilan kemurnian ini dikarenakan masih adanya hasil rasio kemurnian DNA yang memiliki nilai lebih rendah dari 1,8. Nilai tersebut menunjukkan bahwa masih adanya kontaminasi protein pada sampel DNA.

Nilai rata-rata konsentrasi DNA rumput gajah yang menggunakan metode ekstraksi CTAB yang telah dimodifikasi, yaitu 44,8 ng/ μ l dan rata-rata kemurniannya 3,05. Hasil tersebut tidak memenuhi standar konsentrasi dan kemurnian DNA yang dapat dikatakan baik dan murni. Ekstraksi dengan metode CTAB hanya dilakukan pada satu sampel rumput gajah, dikarenakan setelah beberapa kali pengulangan terus menghasilkan kemurnian dan konsentrasi DNA yang

buruk sehingga dianggap bahwa ekstraksi DNA rumput gajah dengan metode CTAB tidak efektif. Menurut Sambrook dan Russel (1989), DNA yang nilainya lebih rendah dari 1,8 menunjukkan sampel DNA terkontaminasi oleh protein, sedangkan kemurnian DNA yang nilainya lebih tinggi dari 2.0 artinya sampel DNA terkontaminasi oleh RNA. Tingkat kemurnian yang rendah juga dapat disebabkan oleh adanya komponen pengotor lainnya yaitu RNA, lipid, dan polisakarida (Alaey *et al.*, 2005). Fatchiyah (2009), DNA yang tidak murni dapat disebabkan oleh adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna. Faktor lain yang menyebabkan DNA tidak murni adalah adanya sisa kandungan metabolit sekunder pada bagian tanaman yang diekstrak. Menurut Borse *et al.* (2011) asam askorbat dapat ditambahkan pada saat proses isolasi DNA untuk mengeluarkan metabolit sekunder yang selama ini tersimpan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan dari ekstraksi DNA pada rumput raja menghasilkan konsentrasi yang lebih tinggi dengan menggunakan metode CTAB, sementara konsentrasi dan kemurnian hasil ekstraksi rumput gajah menghasilkan konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi dengan menggunakan metode kit DNAzol.

Saran

Penggunaan metode ekstraksi CTAB dan DNAzol perlu dimodifikasi agar bisa menghasilkan hasil konsentrasi dan kemurnian yang lebih baik, sehingga keberhasilannya bisa maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, I., M. Islam, W. Arshad, A. Mannan, W. Ahmad, dan B. Mirza. 2009. High quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *J Appl Genet* 50(2):105107.
- Alaey, M., R. Naderi, A. Verzaei, A. Khalighi, and A. Salami. 2005. Comparing study between four different methods of genomic DNA extraction from *Cyclamen persicum* Mill. *International Journal of Agriculture and Biology*. 7(6): 882-884.
- Borse, T., P. Joshi, and S. Chaphalkar. 2011. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *J. Plant. Mol. Biol. Biotechnol.* 2(2): 1-7.
- Fatchiyah, 2009. *Dasar-Dasar Teknik Analisa Biologi Molekuler*. Jakarta : Erlangga.
- Sambrook, J and D. W. Russel. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Edition-3. Cold-Spring Harbor Laboratory Pr. New York.
- Syafaruddin dan T. J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17(1): 11-17.
- Yulia, T. N., J. W. Daniel, dan S. G. A. G. Nur. 2016. Deteksi Molekuler Gen Litik BRLF1 Epstein-Barr Virus pada Penderita Karsinoma Nasofaring. *Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman*. Purwokerto.
- Varma, A., H. Padh, and N. Shrivastava. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Bio-technol. J.* 2: 386-392.