

Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan **Optimization of DNA Isolation from Different Quantity and Quality of Chili (*Capsicum annuum* L.) Leaves and Grinding Technique**

Rejeki Siti Ferniah dan Sri Pujiyanto

¹Department of Biology, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Semarang Indonesia,
Tel/Fax: 024-76480923, Email ferniah_mikro@yahoo.com

Abstract

Complete genome of chili has not been reported. The first step to study the genome is DNA isolation, so it is necessary to optimize the protocol to get an optimum DNA. This research aimed to optimize chili DNA isolation by vary the quantity and quality of chili leaves as raw material and vary the grinding technique. DNA isolation was done using commercial kit without liquid nitrogen, and analyzed by agarose gel electrophoresis. The results showed that frozen chili leaf yields more DNA than fresh leaf, 0,1 g of leaf got optimum DNA, and grinding in mortar was better than in microtube.

Key words: *DNA, isolation, Capsicum annuum*

Abstrak

Penelitian mengenai genom tanaman cabai masih jarang dilakukan, dan sampai saat ini belum ada laporan mengenai genom lengkap tanaman cabai. Langkah pertama untuk mempelajari genom adalah isolasi DNA, sehingga sangat perlu dilakukan optimasi isolasi DNA dari suatu spesies. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi prosedur isolasi DNA tanaman cabai berdasarkan kualitas dan kuantitas daun sebagai bahan dasar serta teknik penggerusan. Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit isolasi DNA tanpa nitrogen cair, kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun yang telah didinginkan pada suhu -20°C , dengan berat daun saat segar 0,1 g, dan penggerusan dalam mortar menghasilkan DNA lebih banyak daripada isolasi dari daun segar dan penggerusan dalam mikrotube.

Kata kunci: *DNA, isolasi, Capsicum annuum*

PENDAHULUAN

Tanaman cabai berasal dari Amerika Selatan (sekitar 7500 SM) sebagai suatu genus *Capsicum*, diperkirakan mempunyai 25 spesies liar sebagai tetuanya. Domestikasi tanaman ini menghasilkan lima spesies yang mempunyai arti ekonomi, yaitu *Capsicum annuum*, *C.frutescens*, *C.chinense*, *C.pubescens*, dan *C.baccatum*. Cabai *C.annuum* didomestikasi pertama kali di Meksiko atau Amerika Tengah bagian utara, *C.frutescens* di Caribia, *C.baccatum* di Bolivia, *C.chinense* di Amazonia, dan *C.pubescens* di Andes bagian selatan (Perry dkk, 2007). Cabai termasuk dalam Divisi *Magnoliophyta* (Angiospermae), Kelas *Magnoliopsida* (Dicotyledoneae), Ordo *Solanales*, Keluarga *Solanaceae*, dan Genus *Capsicum*. Salah

satu spesies hasil domestikasi dan banyak ditanam di Indonesia adalah *C. annuum*.

Benih tanaman cabai dibawa masuk ke Indonesia oleh para pedagang Spanyol sebelum abad ke-17. Saat ini tanaman cabai telah tersebar luas di Indonesia, menempati area produksi terluas untuk kelompok sayur-sayuran. Jika dibandingkan dengan negara-negara Asia lainnya, Indonesia merupakan produsen cabai dengan area tanam terluas ke-3 setelah China dan India (Ali, 2006). Data produksi cabai Indonesia pada tahun 2009 adalah 1.378.727 ton, namun tahun 2010 menurun menjadi 1.328.864 ton (BPS, 2012).

Cabai telah dipelajari secara luas mengenai taksonomi, morfologi, fisiologi, biokimia, maupun penanganan pasca panennya; namun studi genetika tanaman cabai masih jarang dilakukan.

Pengamatan kromosom tanaman cabai menunjukkan bahwa pada umumnya cabai hasil domestikasi mempunyai kromosom diploid, $2n=24$, walaupun ada beberapa spesies yang menunjukkan $2n=26$. Kromosom tanaman cabai sebagian besar berbentuk metasentris dan sedikitnya ada sepasang kromosom yang berbentuk submetasentris. Salah satu pasangan kromosom (biasanya pada kromosom nomor 10, 11, atau 12) diketahui memiliki satelit kromosom (Rohami dkk., 2010). Sayangnya sampai saat ini genom tanaman cabai belum dapat dipetakan secara lengkap.

Isolasi DNA genom merupakan langkah awal dan sangat menentukan dalam studi genetika dan molekuler suatu spesies. Proses tersebut membutuhkan preparasi sampel untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai analisis molekuler maupun manipulasi genetik. Analisis genom dilakukan untuk berbagai sampel dan untuk tiap sampel dibutuhkan optimasi agar diperoleh DNA yang baik dalam jumlah besar. Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penghancuran sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian dan pengendapan DNA (Sambrook *et al*, 1989).

Sel tanaman dilindungi oleh membran sel dan dinding sel yang kuat. Membran sel terdiri dari ikatan antara protein dan lemak, sedangkan dinding sel tersusun atas polisakarida. Dinding sel dan membran sel harus dipecah untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. Penghancuran sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Proses penghancuran sel dipengaruhi oleh jumlah bahan (kuantitas), kondisi bahan (kualitas), dan proses penghancuran itu sendiri. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi teknik isolasi DNA ditinjau dari kualitas dan kuantitas bahan, yaitu daun tanaman cabai, serta proses penggerusan bahan secara mekanik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Benih tanaman cabai merah varietas Horison, media tanam Trubus, pupuk NPK, dan air untuk penyediaan tanaman. Bahan-bahan isolasi DNA adalah kit isolasi DNA *Plant DNAMITE* (Microzone), agarosa (SBS Genetech), buffer Tris-

Asetat-EDTA (Qiagen), pewarna Good Few (SBS Genetech), dan 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

Cara Kerja

1. *Penyiapan Sampel Tanaman Cabai*

Benih cabai direndam dalam larutan NaOCl (0,5% v/v) selama 10 menit untuk sterilisasi, dicuci dengan akuades steril, lalu disemai dalam kotak persemaian. Benih yang dipilih adalah benih yang tenggelam saat perendaman. Media tanam benih adalah media tanam Trubus. Persemaian dilakukan di dalam *green house* dengan suhu 25 - 28°C dan penyiraman teratur setiap pagi hari. Persemaian dilakukan selama 14 hari sampai tumbuh 2 daun sempurna. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke polibag yang berisi media tanam Trubus. Perawatan tanaman dilakukan selama 1 bulan dengan penyiraman setiap hari.

2. *Isolasi DNA Cabai*

Daun tanaman cabai yang dipakai untuk isolasi DNA adalah daun ke-3 dari atas, merupakan daun yang umurnya relatif muda dibandingkan dengan daun-daun di bawahnya. Perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- Daun segar dibandingkan dengan daun yang didinginkan, merupakan optimasi berdasarkan kualitas daun. Daun ditimbang masing-masing 0,2 g, daun segar langsung dilakukan isolasi DNA, dibandingkan dengan daun yang disimpan semalam dalam suhu -20°C dan diisolasi DNA. Perlakuan ini digunakan sebagai pengganti nitrogen cair dalam penggerusan, yaitu daun didinginkan terlebih dahulu.
- Daun dengan berat 0,07 g; 0,1 g; 0,15 g; dan 0,2 g, merupakan optimasi berdasarkan kuantitas daun. Daun-daun yang telah ditimbang ini kemudian disimpan dalam suhu -20°C selama semalam, kemudian digunakan untuk isolasi DNA. Pemilihan kisaran berat daun diambil berdasarkan protokol pada kit isolasi *Plant DNAMITE* yang menyatakan bahwa sampel dapat berupa daun berukuran 1x1 cm – 2x2 cm, pada daun cabai setara dengan 0,07 – 0,2 g daun.
- Variasi teknik penggerusan dilakukan terhadap 0,2 g daun yang telah disimpan semalam pada suhu -20°C. Perlakuan penggerusan dalam

tabung mikrotube dibandingkan dengan perlakuan penggerusan dalam mortar. Perlakuan ini diambil berdasarkan prosedur penggerusan dalam mikrotube menurut Shahzadi dkk. (2010) dibandingkan dengan prosedur umum penggerusan dalam mortar (Sambrook dkk., 1989).

Isolasi DNA tanaman cabai dilakukan menurut prosedur kit isolasi *Plant DNAMITE* dari Microzone. Daun digerus dalam mortar (kecuali pada perlakuan c) dan pelisisan dinding sel dilakukan dengan penambahan buffer LA. Degradasi RNA dilakukan dengan penambahan RNase, kemudian diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Ekstraksi DNA dilakukan dengan buffer PA dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang mengandung DNA dimurnikan dengan buffer CA, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet yang masih berwarna hijau dilarutkan dalam buffer TE dan disentrifugasi kembali 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -4°C .

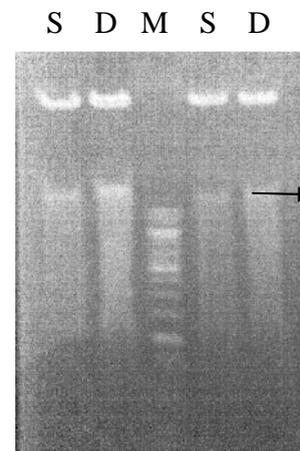
Hasil isolasi DNA dilihat dengan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Gel diwarnai dengan pewarna Good View. Sampel yang dituang ke sumuran adalah 5 μL DNA ditambah 1 μL *loading dye*. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V selama 30 menit. Analisis data dilakukan berdasarkan elektroforegram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman cabai dapat tumbuh dengan baik pada media tanam Trubus di dalam *green house* pada suhu udara $25 - 28^{\circ}\text{C}$ dan penyiraman setiap hari. Umur 30 hari setelah tanam, tanaman cabai telah mempunyai 8 helai daun. Tanaman dengan daun-daun yang sehat akan menghasilkan DNA dengan kualitas baik. Daun yang terserang penyakit jika dilakukan isolasi DNA kemungkinan akan terkontaminasi oleh DNA organisme yang menyebabkan penyakitnya.

1. Kualitas Daun

Hasil isolasi DNA berdasarkan perbedaan kualitas daun ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram DNA genom tanaman cabai, daun segar (S) dibandingkan dengan daun yang didinginkan (D). M: marker 1 Kb DNA ladder. Tanda \rightarrow menunjukkan posisi DNA genom.

Daun segar tanaman cabai berstruktur tipis tetapi liat, sulit untuk dilakukan penggerusan. Sel-sel daun tidak semuanya lisis, sehingga penambahan buffer lisis tidak efektif untuk memisahkan isi sel dengan debris sel. Akibatnya, DNA yang didapat dari daun segar juga sedikit, terlihat dengan tipisnya pita pada hasil elektroforesis gel agarosa (Gambar 1, S). Daun cabai yang telah disimpan pada suhu -20°C selama semalam mempunyai struktur tipis dan lunak. Daun yang lunak lebih mudah digerus sehingga didapatkan bubur daun yang halus dan banyak cairan sel. Penambahan buffer lisis dapat memisahkan isi sel dan debris sel secara optimal. Oleh karena itu, hasil isolasi DNA dari daun yang telah didinginkan (Gambar 1, D) menunjukkan pita yang lebih tebal dibandingkan dengan DNA dari daun segar.

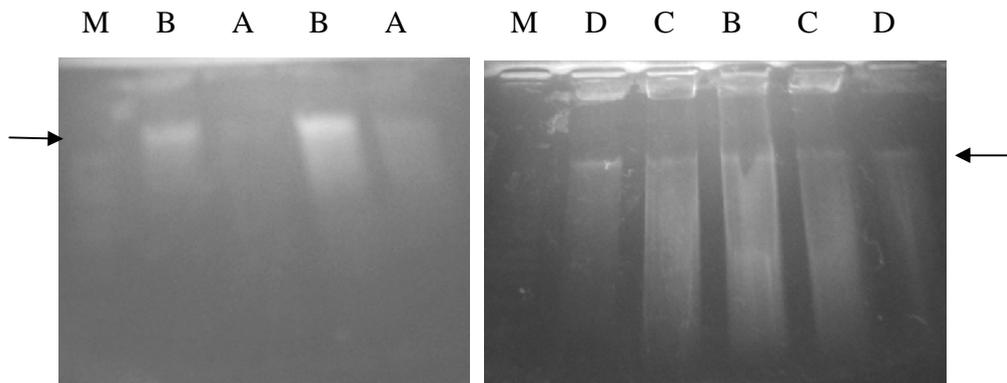
Prosedur isolasi DNA tanaman umumnya menyarankan penggunaan nitrogen cair selama penggerusan sampel jaringan tanaman. Nitrogen cair berfungsi membekukan jaringan sehingga lebih mudah dalam penggerusan. Nitrogen cair jarang digunakan di negara berkembang karena harganya mahal serta membutuhkan ruang berpendingin dan tanki khusus untuk penyimpanan. Berdasarkan penelitian, penggunaan nitrogen cair tidak berpengaruh nyata terhadap

hasil isolasi DNA, sehingga penggunaan nitrogen cair tidak mutlak dilakukan.

Penelitian ini membuktikan bahwa perlakuan pendinginan sampel jaringan tanaman, khususnya daun cabai, dapat meningkatkan perolehan DNA dari daun. Perubahan morfologi daun memudahkan pelisisan sel secara mekanik, yaitu melalui penggerusan daun. Penelitian terhadap jaringan lain atau spesies lain perlu dilakukan untuk membuktikan apakah semua proses pendinginan jaringan sebelum isolasi DNA dapat meningkatkan perolehan DNA.

2. Kuantitas Daun

Kit isolasi *Plant DNAMITE* menyarankan penggunaan sampel daun 1x1 cm – 2x2 cm untuk bahan isolasi DNA tanaman. Ukuran tersebut setara dengan 0,07 – 0,2 g pada daun segar tanaman cabai. Ukuran ini juga sesuai dengan Ferreira and Grattapaglia (1998; dalam Borges dkk. (2012), yang menyatakan bahwa sampel daun sebanyak 0,05 – 0,2 g cukup efektif dalam isolasi DNA tanaman menggunakan metode CTAB. Hasil optimasi isolasi DNA berdasarkan berat (kuantitas) daun ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram DNA genom cabai berdasarkan variasi berat daun. M: *marker* 1 Kb DNA *ladder*, A. 0,07 g; B. 0,1 g; C. 0,15 g; D. 0,2 g. Tanda → menunjukkan posisi DNA genom.

Gambar 2 menunjukkan bahwa dari semua sampel menghasilkan adanya pita, namun dengan ketebalan yang berbeda-beda. Daun segar 0,07 g menghasilkan pita DNA yang sangat tipis, paling tipis di antara sampel lainnya (Gambar 2, lajur A). Kuantitas daun cabai kurang dari 0,1 g dapat digunakan sebagai bahan isolasi DNA, namun menghasilkan DNA yang kurang optimal. Gambar 2 lajur B, C, dan D menunjukkan pita DNA genom cukup jelas, dengan pita paling tebal ditunjukkan oleh lajur B. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel daun 0,1 g menunjukkan hasil terbaik untuk isolasi DNA genom tanaman cabai menggunakan kit *Plant DNAMITE*. Sementara itu tidak tampak nyata perbedaan ketebalan atau kejelasan pita DNA genom antara berat daun 0,1; 0,15; dan 0,2 g. Hal ini sesuai dengan Shahzadi dkk. (2010) bahwa peningkatan jumlah sampel tidak selalu diikuti dengan peningkatan jumlah DNA yang dihasilkan. Dengan demikian

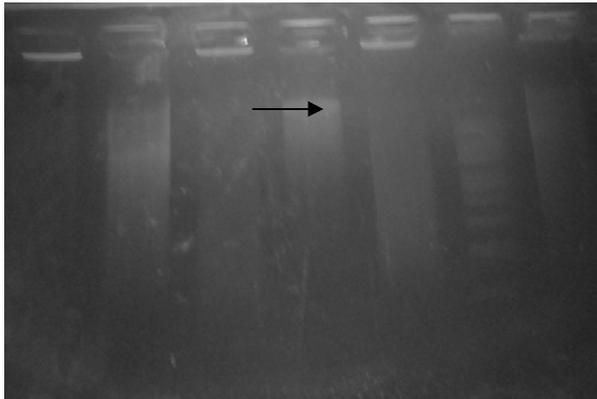
disarankan untuk menggunakan berat awal 0,1 g daun untuk melakukan isolasi DNA dari tanaman cabai. Penggunaan lebih banyak daun tanpa menghasilkan DNA yang lebih baik adalah suatu pemborosan.

3. Teknik Penggerusan

Pelisisan sel pada proses isolasi DNA tanaman pada umumnya diawali dengan penggerusan, merupakan pelisisan sel secara mekanik untuk menghancurkan dinding sel dan membran sel yang melindungi sel-sel tanaman. Keberhasilan dalam penggerusan menentukan proses pelisisan secara kimiawi dan enzimatik, dan selanjutnya menentukan hasil perolehan DNA. Penggerusan umumnya dilakukan dengan mortar dan pestel, namun jurnal terbaru tentang isolasi DNA dari daun tanaman kenikir hias (*Tagetes minuta*) menyarankan penggerusan dilakukan dalam mikrotube (Shahzadi dkk., 2010).

Penelitian ini menunjukkan bahwa proses penggerusan menentukan hasil isolasi DNA, dapat dilihat pada Gambar 3.

Mt Mr Mt Mr Mt M Mr



Gambar 3. Elektroforegram DNA genom cabai dengan variasi teknik penggerusan. Mt: dalam mikrotube, Mr: dalam mortar, M: *marker* 1 Kb DNA *ladder*. Tanda → menunjukkan posisi DNA genom.

Gambar 3 menunjukkan adanya perbedaan hasil isolasi DNA antara perlakuan penggerusan dalam mikrotube (Mt) dan penggerusan dalam mortar (Mr). Penggerusan dalam mortar menghasilkan pita DNA lebih tebal dibandingkan dengan penggerusan dalam mikrotube. Daun yang digerus dalam mikrotube tidak dapat hancur sempurna karena luas permukaan mikrotube sempit dan meruncing di bagian ujung/dasar. Sebagian potongan daun di dasar mikrotube tidak dapat digerus oleh mikropestel sehingga sel-selnya tidak dapat dilisiskan. Dinding mikrotube terbuat dari plastik yang permukaannya halus, hal ini semakin menyulitkan proses penggerusan karena licin. Sebaliknya, mortar terbuat dari porselin yang permukaannya dalamnya dibuat agak kasar, hal ini memudahkan penggerusan. Permukaan mortar yang luas dan cekung menyebabkan penggerusan lebih lapang sehingga semua bagian sampel dapat digerus. Proses penggerusan dalam mortar menghasilkan bubur yang halus dan banyak cairan sel, sehingga pelisisan sel secara mekanik berlangsung dengan baik. Sebaliknya, penggerusan dalam mikrotube menghasilkan bubur yang kasar

dan tidak banyak cairan sel keluar, sehingga pelisisan sel secara mekanik kurang optimal. Pelisisan sel yang kurang baik berarti sedikitnya isi sel yang dapat dikeluarkan, konsekuensinya adalah DNA yang diperoleh juga sedikit.

Berdasarkan ketiga elektroforegram tersebut, maka preparasi bahan dan teknik penggerusan terbukti menentukan keberhasilan isolasi DNA. Setiap tanaman memiliki karakter masing-masing pada setiap jaringan yang dimilikinya, dan hal ini menentukan hasil optimasi. Daun tanaman cabai dengan struktur helaian daun yang tipis tetapi liat saat digerus membutuhkan pendinginan terlebih dahulu sebelum penggerusan. Penggerusan dilakukan dalam mortar untuk menghasilkan bubur yang halus dan banyak cairan sel keluar. Berat daun 0,1 g menghasilkan pita DNA cukup jelas dan tebal dalam elektroforegram.

Optimasi isolasi DNA masih perlu dilakukan pada setiap tahapan proses isolasi DNA, yaitu tahap pelisisan sel, ekstraksi DNA, dan pemurnian DNA. Proses isolasi DNA yang optimal akan mendapatkan DNA dalam jumlah dan kualitas yang cukup baik, sehingga dapat digunakan untuk berbagai analisis molekuler. Isolasi DNA dari daun tanaman cabai dapat dioptimasi dengan cara sebagai berikut.

1. Perlakuan pendinginan daun pada suhu -20°C selama semalam sebelum penggerusan.
2. Massa daun cukup 0,1 g sebagai bahan isolasi DNA dari daun tanaman cabai.
3. Penggerusan daun dilakukan dalam mortar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi tahun anggaran 2012, dibiayai oleh Dirjen Dikti dengan nomor penugasan No. 992/UN7.P/KU/2012. Terima kasih kepada Dirjen Dikti yang telah memfasilitasi penelitian ini. Terima kasih kepada Wahyu Dewi Utari yang telah membantu dalam proses isolasi DNA.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, M. 2006. Chili (*Capsicum* spp.) Food Chain Analysis: Setting Research Priorities in

- Asia. *Technical Bulletin* 38. AVRDC - The World Vegetable Center. Taiwan.
- BPS (Badan Pusat Statistik). 2012. Data Produksi Sayuran.
- Borges, DB, MB. Amorim, AM. Waldschmidt, E. Mariano-Neto, CV. Vivas, DG. Pereira. 2012. Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). *Genet. Mol. Res.* 11 (2).
- Brown, TA. 2008. Genomes. 2nd edition. BIOS Scientific Publisher Ltd.
- Chen, Q, W. Shasha, Z. Deng, L. Yin, B. He, X. Kong. 2009. Optimization of DNA Extraction from Seeds of *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37 (1).
- Miean, KH and S. Mohamed. 2000. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J. Agric. Food Chem* 1.
- Perry, L, R. Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, DM. Pearsall, DR. Piperno, MJ. Berman, RG. Cooke, K. Rademaker, AJ. Ranere, JS. Raymond, DH. Sandweiss, F. Scaramelli, K. Tarble, JA. Zeidler. 2007, Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas, *SCIENCE* VOL 315.
- Sambrook J, EF.Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shahzadi, I, R. Ahmed, A. Hassan and MM. Shah. 2010. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genet. Mol. Res.* 9 (1).
- Syafaruddin dan TJ. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco). *Jurnal Littri* 17(1).
- Utami, A, R. Meryalita, NA. Prihatin, L. Ambarsari, PA. Kurniatin, W. Nurcholis. 2012. Variasi metode isolasi DNA daun temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Variation methods of DNA isolation from leaf of Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa*.