

Optimalisasi ekstraksi DNA jarak pagar (*Jatropha curcas*) melalui pemilihan daun yang sesuai

EDI PRAYITNO, EINSTIVINA NURYANDANI[♥]

Prayitno E, Nuryandani E. 2011. Optimization of DNA extraction of physic nut (*Jatropha curcas*) by selecting the appropriate leaf.

Jatropha curcas L. has important roles as renewable source of bioenergy. The problem occurs on difficult of DNA extraction for its molecular breeding programs. The objectives of this research were to study which leaf best as source of DNA extraction. Four accession were used, namely J1 and J2 (Jawa Tengah), S1 (South Sumatra), and S2 (Bengkulu). First, third, fifth, seventh, and yellow leaves for each accession were extracted using modification of Doyle and Doyle (1987) method. Visualization and comparison with Lambda DNA, Spectrophotometer UV-Vis and cutting DNA with *EcoRI* enzyme were show quality and quantity of DNA. The result showed that third leaves have sufficient quality and quantity as source of DNA. Third leaves DNA quantity for J1 (19.33 µg/mL), J2 (26.21 µg/mL), S1 (31.20 µg/mL), dan S2 (61.03 µg/mL), and quality for each accession were 1.9063 (J1), 2.0162 (J2), 2.0116 (S1), and 2.0856 (S2).

Key words: *Jatropha curcas*, DNA extraction, appropriate, leaf

♥ **Alamat korespondensi:**

¹ Universitas Terbuka, UPBJJ
Semarang, Jl. Semarang-Kendal,
Mangkang Wetan, Semarang 50156,
Jawa Tengah, Indonesia, Tel. +62-24-
8666044, Fax. +62-24-8666045; ♥email:
vina_ut@yahoo.co.id

Manuskrip diterima: 11 November
2010. Revisi disetujui: 24 Februari
2011.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari:
Prayitno E, Nuryandani E. 2011.
Optimization of DNA extraction of
physic nut (*Jatropha curcas*) by
selecting the appropriate leaf.
Nusantara Bioscience 3: 1-6

Prayitno E, Nuryandani E. 2011. Optimalisasi ekstraksi DNA jarak pagar (*Jatropha curcas*) melalui pemilihan daun yang sesuai.

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) mempunyai peran penting sebagai sumber bahan bakar nabati. Usaha pemuliaan tanaman ini secara molekuler sering terkendala sulitnya ekstraksi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daun yang sesuai untuk digunakan sebagai sumber DNA. Penelitian ini dilakukan pada empat aksesi jarak pagar yaitu J1 dan J2 (Jawa Tengah), S1 (Sumatera Selatan), dan S2 (Bengkulu). Ekstraksi dilakukan pada daun pertama, ketiga, kelima, ketujuh, dan daun kuning dari setiap aksesi dengan metode Doyle and Doyle (1987) yang dimodifikasi. Kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi diketahui melalui visualisasi dengan pembandingan DNA lambda, spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260/280, dan pematangan menggunakan enzim *EcoRI*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun ketiga memadai untuk digunakan sebagai sumber DNA. Kuantitas DNA daun ketiga J1 (19,33 µg/mL), J2 (26,21 µg/mL), S1 (31,20 µg/mL), dan S2 (61,03 µg/mL). Sedangkan kemurniannya masing-masing yaitu 1,9063 (J1), 2,0162 (J2), 2,0116 (S1), dan 2,0856 (S2).

Kata kunci: *Jatropha curcas*, ekstraksi DNA, daun, sesuai

PENDAHULUAN

Peningkatan pertumbuhan ekonomi dan pertambahan penduduk memacu tingginya pemakaian energi. Sumber energi dunia saat ini masih didominasi oleh pemakaian Bahan Bakar Fosil (BBF). Hal ini perlu dikaji lebih dalam, karena BBF tidak dapat diperbarui (*unrenewable*). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi permasalahan energi. Potensi energi yang terbarukan diharapkan dapat memecahkan permasalahan ini, antara lain tenaga matahari, panas bumi, angin, arus laut, tanaman penghasil minyak, dan lain-lain. Namun, pemanfaatan energi yang bersumber dari tenaga matahari, angin dan arus laut mengalami kesulitan dalam hal penampungan (*storage*) khususnya untuk

benda bergerak (Raharjo 2007). Bahan bakar dari tanaman memiliki beberapa keunggulan seperti kemudahan penyimpanan dan ramah lingkungan, oleh karena itu Bahan Bakar Nabati (BBN) mendapat prioritas utama untuk dikembangkan.

Pada 25 Januari 2006, Presiden RI mengeluarkan Peraturan Presiden No. 5 Tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional serta Instruksi Presiden No. 1 Tahun 2006 tentang penyediaan dan pemanfaatan bahan bakar nabati (*biofuel*) sebagai bahan bakar lain (alternatif). Selanjutnya pada 1 Juli 2006, presiden dan para pejabat negara melaksanakan *retret* di Desa Losari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Magelang, dan memutuskan untuk mengembangkan bioenergi atau Bahan Bakar Nabati (BBN) sebagai energi

alternatif pengganti Bahan Bakar Minyak (BBM) mulai 2007 (Prihandana *et al.* 2007).

BBN dapat dipilah menjadi dua golongan besar, yaitu bioetanol dan biodiesel. Bioetanol adalah etanol yang diperoleh dari proses fermentasi bahan baku yang mengandung pati atau gula seperti tetes tebu dan singkong. Bahan bakar ini dapat digunakan untuk menggantikan bensin premium (*gasoline*). Etanol yang dapat digunakan adalah alkohol murni yang bebas air (*anhydrous alcohol*) dan berkadar lebih dari 99,5%, atau disebut dengan *fuel grade ethanol* (FGE). Campuran premium dan FGE disebut gasohol. Di Indonesia, Pertamina memberi merek dagang Biopremium untuk produk tersebut. Biodiesel adalah nama populer untuk FAME (*fatty acid methyl ester*), merupakan BBN yang digunakan untuk menggerakkan mesin diesel sebagai pengganti solar. Bahan bakar ini berasal dari minyak nabati yang dikonversi melalui reaksi fisika dan kimia, sehingga sifat kimiawinya telah berubah dari sifat aslinya. Saat ini Pertamina telah mengeluarkan produk semacam ini dengan nama dagang biosolar yang merupakan pencampuran FAME dengan solar biasa (*petrosolar*) (Prihandana *et al.* 2007).

Jarak pagar adalah tumbuhan asli Amerika Tengah (Fairless 2007) dan telah ternaturalisasi di daerah tropis dan subtropis, termasuk Indonesia. Jenis ini tahan kekeringan dan umumnya ditanam sebagai pagar pembatas kebun, namun berguna pula sebagai tanaman semak hias dan tumbuhan obat. Minyak dari biji berguna untuk obat, insektisida, pembuatan sabun dan lilin, serta bahan baku biodiesel (Gubitz *et al.* 1999). Pemanfaatan minyak jarak sebagai bahan biodiesel merupakan alternatif yang ideal, karena merupakan sumber minyak terbarukan (*renewable fuels*) dan *non edible oil* sehingga tidak bersaing dengan kebutuhan konsumsi manusia, seperti pada minyak kelapa sawit, jagung, kedelai dan lain-lain (Dwimahyani 2005). Disamping itu, jarak pagar juga mengandung metabolit sekunder yang berguna sebagai protektan bagi tanaman dan sebagai bahan obat bagi manusia (Debnath dan Bisen 2008)

Beberapa kendala ditemui dalam pengembangan minyak jarak antara lain keterbatasan informasi tentang varietas unggul yang memiliki sifat-sifat menguntungkan seperti produksi yang tinggi, perbanyakkan yang cepat, rendemen minyak yang tinggi dalam bijinya, serta sifat ketahanan terhadap hama dan penyakit. Hal ini terjadi karena selama ini

tanaman jarak pagar hanya dianggap sebagai tanaman pagar yang memiliki nilai ekonomi rendah sehingga penelitian dan pengembangan tanaman ini jarang dilakukan. Untuk mengatasi hal ini, pemuliaan tanaman memiliki peran yang signifikan.

Pencirian tanaman jarak pagar di Indonesia masih dilakukan secara sederhana dan tidak bersifat universal. Seringkali, penyebutan jenis tanaman jarak pagar hanya berdasarkan penampilan fenotipe maupun daerah asalnya. Pencirian menggunakan deskripsi morfologi atau fenotipe memiliki keterbatasan karena sangat dipengaruhi lingkungan. Ciri morfologi yang berbeda dapat saja akibat pengaruh lingkungan, sedangkan genotipenya sama, sebaliknya ciri morfologi yang sama belum tentu menunjukkan bahwa kedua jenis tanaman berkerabat dekat, karena bentuk luar suatu tumbuhan merupakan hasil kerjasama antara genotipe dengan lingkungan (Joshi *et al.* 1999; Karsinah 1999). Oleh karena itu, perlu dikembangkan suatu informasi genetik yang bersifat universal. Penanda molekuler dapat memberikan informasi secara universal karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Azrai 2005), sehingga mampu menjawab permasalahan dalam karakterisasi tanaman jarak pagar.

Jarak pagar merupakan salah satu tanaman yang banyak mengandung getah, yang sejatinya merupakan metabolit sekunder tanaman. Keberadaan metabolit sekunder seperti polifenol, tanin, dan polisakarida dapat menghambat kerja enzim (Porebski 1997; Pirtilla *et al.* 2001). Isolasi DNA pada tanaman jarak kerap mengalami kendala akibat tingginya kadar metabolit sekunder yang berupa polisakarida dan polifenol. Menurut Sharma *et al.* (2002) keberadaan metabolit pada beberapa tanaman mempengaruhi prosedur isolasi DNA, dia menggunakan modifikasi CTAB untuk mengisolasi DNA dari jaringan tanaman yang mengandung polisakarida tinggi. Senada dengan hal ini Kiefer *et al.* (2000), Pirtilla *et al.* (2001) serta Sanchez-Hernandes, C. dan J.C. Gaytan-Oyarzun (2006), menyatakan bahwa ekstraksi DNA dan RNA dari tanaman yang mengandung polisakarida, polifenol serta getah dan sulit dilakukan.

Teknik ekstraksi DNA yang tepat sangat diperlukan dalam proses pemuliaan tanaman untuk memperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi. Untuk mendapatkan DNA yang murni dari tanaman bergetah, umumnya dilakukan pemurnian berulang-ulang dan

modifikasi prosedur (Kiefer *et al.* 2000), sehingga membutuhkan tambahan biaya dan tenaga. Untuk itu, dapat digunakan bagian tanaman yang mengandung sedikit metabolit sekunder. Kandungan metabolit sekunder pada jaringan tanaman berubah-ubah seiring dengan perkembangannya. Kandungan metabolit sekunder dapat berbeda-beda karena perbedaan umur dan bagian tanaman (Cirak *et al.* 2007a,b, 2008; Achakzai *et al.* 2009). Oleh karena itu, untuk mempermudah proses ekstraksi DNA jarak pagar, perlu dilakukan penelitian untuk mempelajari bagian tanaman yang mengandung metabolit sekunder dalam jumlah sedikit dan menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari daun tanaman jarak pagar pada berbagai tingkatan perkembangan yang berpotensi untuk menghasilkan kualitas dan kuantitas DNA terbaik dalam proses ekstraksi DNA.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di UPBJJ-Universitas Terbuka Semarang, Laboratorium Pusat Penelitian Buah Tropika IPB, Bogor, Jawa Barat, dan Laboratorium Struktur dan Fungsi Tumbuhan Universitas Diponegoro Semarang pada Maret-November 2009.

Bahan tanaman

Bahan tanaman jarak pagar yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga aksesori tanaman jarak pagar yang berasal dari wilayah Klaten (Jawa Tengah) dengan kode J1 dan J2, Palembang (Sumatera Selatan) dengan kode S1, dan Bengkulu dengan kode S2.

Cara kerja

Isolasi DNA. Sebanyak 0,5 g daun jarak pagar dari daun pertama, ketiga, kelima, ketujuh dan daun yang kuning dari masing-masing sampel dihaluskan dalam cawan porselin dengan menambahkan pasir silika 0,1 gram agar mudah digerus. Untuk mencegah pencokelatan jaringan akibat oksidasi, ke dalam cawan berisi sampel ditambahkan *polivinilpolipirilidon* (PVPP) sebanyak 40 mg dan ditambah bufer ekstraksi (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA) sebanyak 1 mL yang telah ditambah 1% merkaptotanol. Sampel yang sudah halus dimasukkan ke dalam tabung

ependorf volume 1,5 mL. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit sambil dibolak-balik, kemudian ditambahkan 1 mL larutan kloroform: isoamilalkohol (24:1 = v/v) dan divortek selama 5 detik. Larutan ini kemudian dipisahkan menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipisahkan dari pelet dengan jalan memipetnya ke dalam tabung Ependorf baru.

DNA dalam supernatan dimurnikan dengan menambahkan 1 mL larutan kloroform: isoamilalkohol (24:1 = v/v) dan disentrifuse pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung dan ditambah 1 mL isopropanol dingin, dikocok perlahan sampai timbul benang-benang putih yang merupakan DNA. Selanjutnya DNA diendapkan dengan diinkubasi selama 30 menit pada suhu -20°C. Larutan berisi DNA yang sudah dimurnikan disentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan selanjutnya supernatan dibuang. Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol 70% serta dikeringkan pada suhu ruangan. Selanjutnya endapan DNA contoh yang diperoleh dilarutkan dalam 100 µL bufer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; 10 mM EDTA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam kemudian dicampur hingga merata untuk selanjutnya diuji kualitasnya.

Uji kualitas dan kuantitas DNA. Kuantitas (konsentrasi) dan kualitas DNA ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Penentuan kuantitas DNA total dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm. Nilai A pada λ 260 = 1,0 setara dengan jumlah DNA 50 µg/mL. Kualitas DNA dinilai baik jika nilai A₂₆₀/A₂₈₀ mendekati 1,8-2. Untuk menetapkan konsentrasi dan kualitas DNA, hasil elektroforesis direndam dalam larutan EtBr 1% kemudian diamati di bawah UV transluminator. Kuantitas DNA ditetapkan berdasarkan ketebalan pita DNA contoh hasil elektroforesis yang dibandingkan dengan besarnya pita DNA lambda yang sudah diketahui konsentrasinya, yaitu sebanyak 250 µg/mL. Penelitian ini juga menguji kualitas DNA dengan pemotongan DNA genom menggunakan enzim *EcoRI* yang divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarosa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Visualisasi hasil ekstraksi DNA

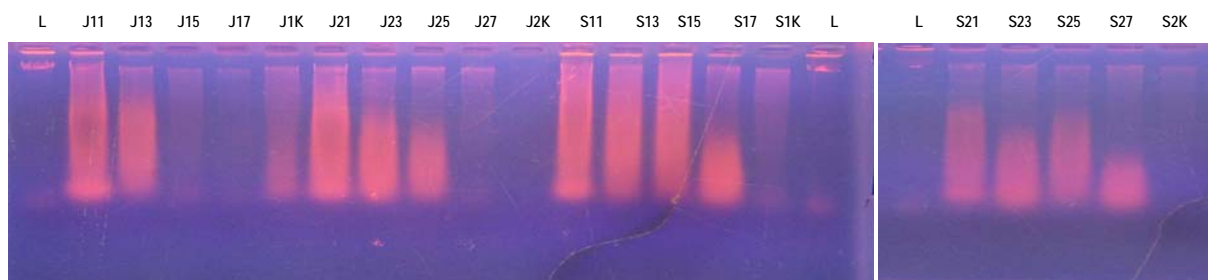
Kesuksesan proses isolasi dan ekstraksi DNA genom dapat ditandai dengan dihasilkannya DNA yang berukuran besar (*high molecular weight DNA*), tidak terdegradasi selama proses ekstraksi dan pemurnian, serta dapat dipotong oleh enzim restriksi yang digunakan (Herison 2003). Hasil isolasi dan ekstraksi DNA jarak pagar menggunakan metode Doyle and Doyle (1987) yang dimodifikasi telah dapat menghasilkan pita DNA genom yang dikehendaki meskipun kuantitasnya relatif kecil bila dibandingkan dengan DNA lambda. DNA genom terlihat sebagai pita yang menyala di bagian atas sumuran hasil elektroforesis.

Secara umum, *smear* pada hasil ekstraksi DNA dari daun muda (kode J11, J21, S11, S21) terlihat lebih tinggi dan pekat dibandingkan *smear* pada hasil ekstraksi DNA dari daun yang lebih tua, kemudian berangsur-angsur *smear* semakin menurun kepekatannya pada daun yang lebih tua (daun ketiga, kelima, dan ketujuh), dan *smear* yang paling sedikit terdapat pada daun kuning, kecuali pada J1 dimana J1k (kuning) memiliki pita *smear* yang lebih tebal dibandingkan J15 dan J17 (Gambar 2).

Pada hasil ekstraksi DNA genom dari daun muda, terlihat *smear* yang berada di bagian bawah DNA genom. Pita *smear* tersebut merupakan molekul dengan bobot yang bervariasi yang dapat berasal dari DNA yang terdegradasi ataupun materi ikutan lain yang tidak diketahui (Herison 2003). *Smear* mengindikasikan bahwa DNA genom yang diisolasi sudah tidak utuh lagi, kemungkinan terpotong-potong saat ekstraksi berlangsung (Sisharmini *et al.* 2001). Kerusakan DNA genom ini dapat terjadi akibat degradasi senyawa sekunder yang dilepaskan ketika sel dihancurkan atau kerusakan akibat penanganan fisik.

Penurunan *smear* ini kemungkinan dipengaruhi oleh metabolit sekunder tanaman dan penanganan fisik. Dalam hal ini penanganan fisik untuk setiap sampel dapat dikatakan sama karena menggunakan prosedur standar yang sama, oleh karena itu, pengaruh terbesar yang menyebabkan perbedaan *smear* adalah tinggi rendahnya metabolit sekunder dari daun tanaman (Milligan 1992).

Pada tanaman tertentu, metabolit tanaman secara visual akan terlihat dalam bentuk getah. Jarak pagar merupakan tanaman bergetah, dengan getah berwarna pink (de Padua *et al.* 1999) atau bening pada bagian yang muda yang lama kelamaan akan berwarna keruh/lebih tua jika dibiarkan di udara bebas ataupun coklat tua bila diambil dari bagian tanaman yang lebih tua (Heyne 1987). Daun muda memiliki kandungan metabolit sekunder lebih banyak dibanding dengan daun tua (Badawi 2006; Mulyani 2006). Daun muda umumnya memiliki kandungan metabolit sekunder dan enzim yang tinggi karena diperlukan dalam proses pertumbuhan, perkembangan, dan pembelahan sel-sel daun tersebut. Pada perkembangannya konsentrasi metabolit sekunder tanaman akan berangsur menurun seiring penurunan aktivitas perkembangan daun tersebut, dan pada daun yang telah menguning, konsentrasi enzim dan metabolit sekunder pada daun mengalami penurunan yang signifikan akibat berlangsungnya proses senesensi (Salisbury dan Ross 1995). Pada tahap ini tanaman akan menarik zat dan enzim yang masih berguna bagi tanaman tersebut dari daun tua untuk digunakan dalam proses perkembangan bagian tanaman yang lebih muda, sehingga kemungkinan metabolit sekunder tanaman terdapat pada level yang sangat rendah sehingga DNA tidak banyak yang terdegradasi oleh senyawa ikutan tersebut (Salisbury dan Ross 1995; Herison 2003).



Gambar 2. Visualisasi hasil ekstraksi DNA empat aksesori jarak pagar dari Klaten (J1, J2), Palembang (S1) dan Bengkulu (S2). L = Lamda (ladder)

Meskipun *smear* pada daun yang lebih tua semakin sedikit, namun kuantitas DNA genom juga semakin menurun, dimana pita menyala DNA genom di bagian atas sumuran yang semakin menipis pada daun yang lebih tua.

Daun muda memiliki aktifitas pembelahan yang tinggi. Pada proses pembelahan, DNA akan mengalami replikasi, sehingga jumlah DNA akan mengganda, dengan demikian konsentrasi DNA yang ada pada daun muda relatif tinggi. Pada daun yang lebih tua, proses pembelahan akan semakin menurun, hingga akhirnya berhenti sama sekali. Pada daun yang telah menguning, selain tidak adanya proses pembelahan, hal ini juga diperparah adanya kematian sel-sel yang telah tua sehingga jumlah DNA juga menurun drastis (Salisbury dan Ross 1995).

Uji kualitas dan kuantitas DNA dengan spektrofotometer UV-Vis

Kuantitas (konsentrasi) dan kualitas DNA ditentukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Penentuan kuantitas DNA total dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm. Kemurnian DNA tertinggi dapat dilihat pada perbandingan $A_{260}/280$ yang menghasilkan nilai 1,8-2. Menurut Sambrook *et al.* (1989) DNA dengan ratio pada kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan kemurnian yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Hasil spektrofotometer menunjukkan kemurnian DNA yang relatif baik meskipun belum dapat mencapai kemurnian 100% pada beberapa aksesori. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom yang dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Tabel 1.

DNA genom yang memiliki kemurnian 100% terdapat pada aksesori J1 hasil ekstraksi dari daun ketiga dengan nilai rasio 1,9063. DNA genom dari daun pertama aksesori J1 ini memiliki nilai rasio yang mendekati kemurnian 100% dengan

nilai rasio 2,0131. Sedangkan ketiga daun lainnya, yaitu daun kelima, ketujuh, dan daun kuning memiliki nilai rasio kurang dari 1,8 masing-masing, 1,7417, 1,2578, dan 1,2356. Hasil ekstraksi DNA daun pertama, ketiga, dan kelima dari aksesori J2 memiliki nilai rasio mendekati kemurnian yaitu masing-masing 2,0697, 2,0162, 2,0914, sedangkan daun ketujuh dan daun kuning memiliki nilai rasio yang masih jauh dari kemurnian, yaitu 1,5873 dan 1,1940.

Pada aksesori S1, hampir semua hasil ekstraksi DNA daun mendekati kemurnian, masing-masing dari daun pertama, ketiga, kelima, dan ketujuh rasionya adalah 2,0768, 2,0116, 2,0792, 2,0225, sedangkan daun kuning memiliki nilai rasio yang jauh dari kemurnian yaitu 1,4434. Hasil ekstraksi DNA daun pertama dan ketiga dari aksesori S2 mendekati kemurnian dengan nilai rasio 2,0611 dan 2,0856. Sedangkan daun kelima, ketujuh, dan daun kuning memiliki rasio yang jauh dari kemurnian dengan rasio masing-masing 2,2187, 2,1782, 1,5177.

Selain kemurnian sampel DNA genom, pertimbangan lain yang harus diperhatikan adalah kuantitas DNA genom yang dihasilkan dari proses ekstraksi DNA. Pembacaan $A_{260} = 1$ berarti konsentrasi DNA yang didapat sebesar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Herison 2003). Konsentrasi DNA genom hasil ekstraksi dihitung dengan rumus sebagai berikut: Konsentrasi DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $A_{260} \times$ faktor pengenceran $\times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Konsentrasi DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi merepresentasikan jumlah DNA yang dikandung dari jaringan daun yang digunakan sebagai sampel karena metode dan perlakuan yang digunakan pada setiap sampel adalah sama. Tabel 1 berikut merupakan konsentrasi DNA dari dua puluh sampel daun yang berasal dari empat aksesori tanaman jarak pagar yang dipergunakan. Dari Tabel 1, diketahui perbandingan konsentrasi DNA genom dari masing-masing jaringan daun pertama, ketiga,

Tabel 1. Uji kualitas (kemurnian) dan kuantitas (konsentrasi) DNA menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada empat aksesori jarak pagar dari Klaten (J1, J2), Palembang (S1) dan Bengkulu (S2).

Daun	Kemurnian DNA				Konsentrasi DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	J1	J2	S1	S2	J1	J2	S1	S2
Pertama	2,0131	2,0697	2,0768	2,0611	27,69	62,06	67,61	101,35
Ketiga	1,9063	2,0162	2,0116	2,0856	19,33	26,21	31,20	61,03
Kelima	1,7417	2,0914	2,0792	2,2187	3,68	27,69	46,71	44,18
Ketujuh	1,2578	1,5873	2,0225	2,1782	2,03	5,37	22,90	26,27
Kuning	1,2356	1,1940	1,4434	1,5177	4,51	4,37	7,59	5,37

kelima, ketujuh, dan daun kuning, serta perbandingan konsentrasi DNA genom antaraksesi. Secara umum terlihat penurunan konsentrasi DNA genom seiring dengan peningkatan umur daun yang digunakan sebagai sampel.

Sampel dari daun pertama menunjukkan kuantitas DNA genom yang jauh lebih besar daripada sampel daun ketiga, kelima, ketujuh, dan daun kuning. Pengukuran kuantitas DNA genom sampel aksesori J1 yang berasal dari Klaten menghasilkan DNA genom yang relatif sedikit dibandingkan aksesori J2, S1, dan S2, yaitu 27,69 µg/mL untuk daun pertama, 19,33 µg/mL untuk daun ketiga, 3,68 µg/mL untuk daun kelima, 2,03 µg/mL untuk daun ketujuh, dan 4,51 µg/mL untuk daun kuning. Hal ini disebabkan jumlah sampel yang lebih sedikit dibandingkan aksesori lain akibat tumpahnya sebagian sampel oleh laboran yang mengerjakan, sehingga sampel DNA yang diuji berkurang. Sedangkan pada aksesori J2, dimana aksesori ini juga berasal dari asal yang sama dengan aksesori J1, yaitu berasal dari Klaten, Jawa Tengah, dan berasal dari induk yang sama, kuantitas DNA genom yang dihasilkan lebih besar dibandingkan J1, yaitu 62,06 µg/mL untuk hasil ekstraksi daun pertama, 26,21 µg/mL untuk daun ketiga, 27,69 µg/mL untuk daun kelima, 5,37 µg/mL untuk daun ketujuh, dan 4,37 µg/mL untuk daun kuning.

Konsentrasi DNA genom untuk aksesori S1 pada daun pertama menghasilkan 67,61 µg/mL DNA, sedangkan pada daun ketiga, konsentrasi DNA genom adalah 31,20 µg/mL, pada daun kelima 46,71 µg/mL, pada daun ketujuh, 22,90 µg/mL, dan pada daun kuning sebesar 7,59 µg/mL. Aksesori S2 pada daun pertama menghasilkan 101,35 µg/mL DNA genom, sedangkan pada daun ketiga, konsentrasi DNA genom adalah 61,03 µg/mL, pada daun kelima 44,18 µg/mL, daun ketujuh, 26,27 µg/mL, dan pada daun kuning sebesar 5,37 µg/mL. Angka ini menunjukkan konsentrasi DNA genom hasil ekstraksi yang semakin menurun. Hal ini berkaitan dengan fase perkembangan daun yang telah dijabarkan di atas.

Hasil spektrofotometer untuk kuantitas DNA genom di atas menunjukkan bahwa kuantitas DNA genom terbesar dari keempat aksesori didapati pada hasil ekstraksi dari daun pertama. Namun dengan mempertimbangkan kualitas DNA yang dihasilkan, kemurnian tertinggi yang mendekati 100% didapati pada sampel yang menggunakan daun ketiga sebagai sumber DNA genom, meskipun dari segi kuantitas, jumlahnya

lebih rendah dari sampel yang berasal dari daun pertama.

Perbandingan hasil ekstraksi DNA dari lima jenis daun contoh yang digunakan dari aksesori J1 dan J2 yang berasal dari Klaten, dari sebuah pohon induk yang sama dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 tersebut dapat dilihat bahwa DNA genom dari daun pertama dan kedua (aksesori J1) dan daun pertama, ketiga, dan kelima (aksesori J2) mendekati kemurnian, namun yang paling mendekati kemurnian adalah pada daun ketiga (pada aksesori J1 dengan rasio 1,9063 (kemurnian 100%) dan pada aksesori J2 dengan rasio 2,0162). Namun dari segi kuantitas, J1 dan J2 tidak dapat diperbandingkan meski berasal dari induk yang sama karena sampel dari J1 tidak sama dengan J2 dari segi jumlah sampel yang diuji karena tumpahnya sampel oleh laboran.

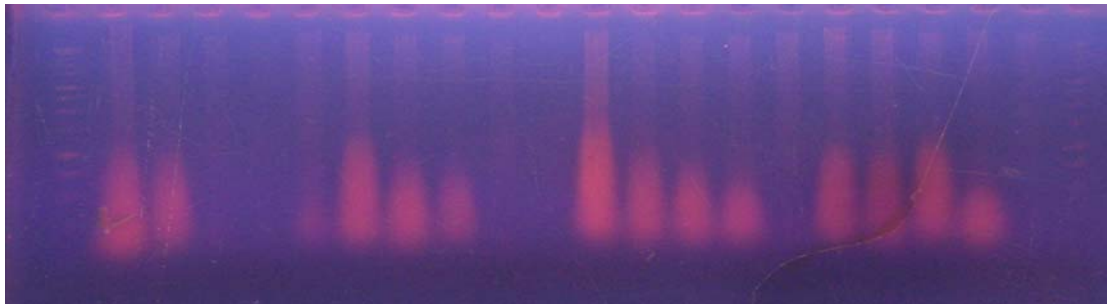
Beberapa penelitian menunjukkan bahwa umumnya daun muda cenderung digunakan dalam ekstraksi DNA karena kemudahannya dalam mendapatkan DNA dengan kuantitas yang tinggi. Mansyah *et al.* (2003) yang melakukan penelitian pada tanaman manggis menyatakan bahwa ekstraksi DNA dari daun tua lebih sulit jika dibandingkan dengan daun muda, sehingga untuk memperoleh DNA dari daun tua dengan kuantitas yang cukup diperlukan perlakuan khusus, yaitu dengan penambahan jumlah daun yang diekstrak sampai 2 g dan pemurnian DNA dengan penambahan RNase. Sedangkan Prana (2003) yang melakukan ekstraksi DNA pada tanaman talas juga menggunakan daun muda (dalam hal ini daun pucuk) sebagai sumber DNA.

Uji kualitas DNA dengan pemotongan menggunakan enzim *EcoRI*

Kemurnian DNA dapat dilihat dari dapat tidaknya suatu contoh DNA dipotong oleh enzim restriksi seperti *EcoRI*. Jika suatu contoh DNA memiliki kemurnian yang tinggi, DNA ini akan mudah untuk dipotong oleh enzim restriksi. Namun jika contoh DNA ini masih mengandung material ikutan seperti metabolit sekunder, karbohidrat, protein, dan lainnya, akan menghalangi kerja enzim restriksi.

Dapat tidaknya DNA dipotong dengan enzim restriksi terlihat dari terbentuk tidaknya pita smear hasil elektroforesis setelah DNA dipotong dengan enzim *EcoRI* (Herison 2003). *EcoRI* menghasilkan pita DNA smear ketika dielektroforesis karena enzim restriksi ini termasuk ke dalam frequent cutter (Vos *et al.*

M J11 J13 J15 J17 J1k J21 J23 J25 J27 J2K S11 S13 S15 S17 S1K S21 S23 S25 S27 S2k M



Gambar 3. Visualisasi hasil pemotongan oleh enzim *EcoRI* pada empat aksesori jarak pagar dari Klaten (J1, J2), Palembang (S1) dan Bengkulu (S2).

1995). Hasil pemotongan dengan enzim *EcoRI* menghasilkan potongan DNA yang terlihat sebagai smear pada beberapa sampel, namun sebagian besar sampel lainnya tidak dapat dipotong oleh enzim tersebut karena tingginya senyawa ikutan yang menghalangi kerja enzim. Smear hanya dapat diamati pada J13 dan J15, sedangkan pada sampel yang lain belum terlihat smear yang jelas sebagai hasil kerja enzim *EcoRI*. Yang terlihat adalah adanya senyawa ikutan yang berada di bagian bawah sumuran. kemungkinan material ikutan inilah yang menghambat kerja enzim *EcoRI* sehingga tidak dapat memotong DNA genom jarak pagar yang diujikan.

Uraian pembahasan di atas memperlihatkan bahwa perbedaan umur jaringan daun yang digunakan berpengaruh terhadap hasil ekstraksi DNA genom dimana daun yang lebih muda akan menghasilkan kuantitas DNA genom yang lebih tinggi namun juga disertai oleh tingginya material ikutan berupa metabolit sekunder tanaman yang menghambat kerja di bidang molekuler selanjutnya. Daun yang lebih tua menghasilkan jumlah DNA genom yang relatif lebih sedikit dibandingkan daun muda, namun metabolit sekunder yang mengikuti juga berkurang jumlahnya. Penelitian ini menunjukkan bahwa daun ketiga relatif lebih baik digunakan sebagai sumber DNA genom mengingat kemurnian DNA yang dihasilkan lebih baik dibanding dari daun lainnya, serta kuantitas DNA yang dihasilkan cukup banyak untuk dapat digunakan untuk analisis molekuler selanjutnya.

KESIMPULAN

Daun ketiga tanaman jarak pagar cocok digunakan sebagai sumber DNA bagi analisis molekuler genom, karena secara kuantitas maupun kualitas menghasilkan DNA genom yang memadai bagi analisis molekuler lanjut seperti PCR. Hasil ekstraksi DNA genom dari daun ketiga umumnya mendekati kemurnian 100% dan kuantitas DNA yang dihasilkan juga cukup besar untuk dipergunakan bagi analisis molekuler selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achakzai AKK, Achakzai P, Masood A, Kayan SA, Tareen RB. 2009. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pak J Bot* 41 (5): 2129-2135.
- Azrai M. 2005. Pemanfaatan markah molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *J Agrobiogen* 1 (1): 26-37.
- Badawi A. 2007. Pengaruh tingkat ketuaan daun dan dosis filtrat daun saga (*Abrus precatorius*) terhadap kadar bilirubin serum darah tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄) [Tesis S1]. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Cirak C, Radušienė J, Ivanauskas L, Janulis V. 2007b. Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum perforatum* during its phenological cycle. *Acta Physiol Plant* 29: 197-203.
- Cirak C, Radušienė J, Janulis V, Ivanauskas L. 2007a. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Bot Helv* 117: 29-36.
- Cirak C, Radušienė J, Janulis V, Ivanauskas L. 2008. Pseudohypericin and hyperforin in *Hypericum perforatum* from Northern Turkey; variation among populations, plant parts and phenological stages. *J Integ Plant Biol* 50: 575-580.

- De Padua LS, Bunyaprahatsara N, Lemmens RHMJ. 1999. Plant Resources of South East Asia No. 12 (1) Medicinal and poisonous plants. Backhuys. Leiden.
- Debnath M, Bisen PS. 2008. *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. *Curr Pharm Biotechnol* 9 (4): 288-306.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Dwimahyani I. 2005. Pemuliaan mutasi tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). P3TIR-BATAN. Jakarta.
- Fairless D. 2007. Biofuel: The little shrub that could - maybe. *Nature* 449: 652-655.
- Gübitz GM, Mittelbach M, Trabi M. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresour Technol* 67: 73-82.
- Herison C, Rustikawati, Eliyanti. 2003. Penentuan protokol yang tepat untuk menyiapkan DNA genom cabai (*Capsicum* sp.). *J Akta Agrosia* 6 (2): 38-43.
- Heyne K. 1987. Tumbuhan berguna Indonesia II. Yayasan Sarana Wanajaya. Jakarta.
- Instruksi Presiden No. 1 Tahun 2006 tanggal 25 Januari 2006 tentang penyediaan dan pemanfaatan bahan bakar nabati (biofuel) sebagai bahan bakar lain
- Joshi SP, Ranjekar PK, Gupta VS. 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Curr Sci* 77 (2): 230-240.
- Karsinah. 1999. Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kiefer E, Heller W, dan Ernst D. 2000. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep* 18 : 33-39.
- Mansyah E, Baihaki A, Setiamihardja R, Darsa JS, Sobir. 2003. Analisis variabilitas genetik manggis (*Garcinia mangostana* L.) di Jawa dan Sumatera Barat menggunakan teknik RAPD. *Zuriat* 14 (1): 36-44.
- Milligan BG. 1992. Plant DNA isolation. In: Hoelzel AR (ed). *Molecular genetic analysis of populations; a practical approach*. Oxford University Press. New York.
- Mulyani A, Agus F, Allelorung D. 2006. Potensi sumber daya lahan untuk pengembangan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) di Indonesia. *J Litbang Pertanian* 25(4): 130-138.
- Peraturan Presiden No. 5 Tahun 2006 tanggal 25 Januari 2006 tentang kebijakan energi nasional Porebski S, Bailey LG, Baum BR. 1997. Commentary modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15 (1): 8-15.
- Pirtilla AM, Hirsikorpi M, Kamarainen T, Zaakola L, and Hohtola A. 2001. DNA isolation method for medicinal and aromatic plants. *Plant Mol Biol Rep* 19:273a-273f.
- Prana TK, Hartati NS. 2003. Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR. *J Natur Indonesia* 5 (2): 107-112.
- Prihandana R, Hambali E, Mujdalipah S, Hendroko R. 2007. Meraup untung dari jarak pagar. *Agromedia Pustaka*. Jakarta.
- Raharjo S. 2007. Analisa performa mesin diesel dengan bahan bakar biodiesel dari minyak jarak pagar. Seminar Nasional Teknologi 2007 (SNT 2007). Yogyakarta, 24 November 2007.
- Sanchez-Hernandes C dan Gaytan-Oyarzun JC. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *African J of Biotechnol.* 5 (20): 1864-1867.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi tumbuhan*. ITB Press. Bandung.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab Press. New York.
- Sisharmini A, Ambarwati AD, Santoso TJ, Utami, DW Herman. 2001. Teknik isolasi DNA dan analisis PCR gen *pinII* pada genom ubi jalar. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Bogor, 26-27 Desember 2001.
- Sharma AD, Gill PK, dan Singh P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol Biol Rep* 20 : 415a-415f.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414