

**Review Artikel: Metode Ekstraksi DNA Genom untuk Tanaman Tinggi Kandungan Polisakarida dan Metabolit Sekunder****Article Review: Genomic DNA Extraction Method for Plants with High Levels of Polysaccharides and Secondary Metabolites**

Vega Kartika Sari*, Didik Pudji Restanto

Program Studi Agronomi, Universitas Jember, Jember, Indonesia

*Penulis Korespondensi

Email: vegakartikas@unej.ac.id

Abstrak. Ekstraksi DNA merupakan tahap awal yang menentukan kuantitas dan kualitas DNA genom yang diperoleh. Penggunaan daun muda pada tanaman tahunan tidak selalu ada, alternatifnya menggunakan daun agak tua, namun banyak mengandung polifenol dan polisakarida. Tujuan artikel review ini untuk menjelaskan terkait modifikasi metode ekstraksi DNA yang efektif untuk tanaman dengan kandungan tinggi polisakarida dan polifenol. Modifikasi metode ekstraksi DNA tanaman seringkali perlu dilakukan karena tiap tanaman mengandung metabolit yang berbeda sehingga perlu penanganan yang berbeda pula. Terdapat berbagai metode ekstraksi DNA tanaman. Metode CTAB merupakan metode yang paling banyak digunakan dan dikembangkan. Modifikasi metode dilakukan untuk mendapatkan DNA genom yang berkualitas, melalui peningkatan konsentrasi TrisHCL, β -mercaptoethanol, NaCl, dan PVP, pengulangan tahapan purifikasi, ataupun penambahan kemikalia seperti RNase. Modifikasi dilakukan disesuaikan dengan jenis tanaman yang digunakan, sehingga optimasi diawal perlu dilakukan untuk menentukan metode yang tepat. Perbandingan modifikasi ekstraksi pada beberapa jenis tanaman pada tiap tahapan ekstraksi serta pengaruhnya pada kualitas DNA yang diperoleh dapat menjadi tolak ukur dalam penentuan modifikasi yang akan dilakukan disesuaikan dengan jenis tanaman yang akan diuji.

Kata kunci: ekstraksi DNA, modifikasi metode, polifenol, polisakarida

Abstract. DNA extraction is the initial stage that determines the quantity and quality of the genomic DNA obtained. The use of young leaves in annual plants is not always available, the alternative is to use mature leaves, but contain lots of polyphenols and polysaccharides. The purpose of this review article is to describe the modification of an effective DNA extraction method for plants with a high content of polysaccharides and polyphenols. Modification of DNA extraction methods often needs to be done because each plant contains different metabolites so that different treatments are needed. There are various methods of extracting plant DNA. The CTAB method is the most widely used and developed method. Modification of the method is carried out to obtain quality genomic DNA, it can be through increasing the concentration of TrisHCL, β -mercaptoethanol, NaCl, and PVP, repeating the purification steps, or adding chemicals such as RNase. Modifications are made according to the type of plant used, so optimization needs to be done at the beginning to determine the right method. Comparison of extraction modifications on several types of plants at each extraction stage and the effect on the DNA quality obtained can be used as a benchmark in determining the modifications to be carried out according to the type of plant to be tested.

Keywords: DNA extraction, modification method, polyphenol, polysaccharides

1. Pendahuluan

DNA genom terdiri atas semua material genetik pada kromosom. Ekstraksi DNA merupakan proses pemisahan materi genetik dari sel, termasuk membran seluler, RNA dan protein lainnya. Ekstraksi DNA merupakan metode dasar yang penting dan turut menentukan keberhasilan rangkaian kegiatan molekuler. DNA yang berkualitas tinggi hasil ekstraksi harus dipenuhi dalam analisis molekuler. Berbagai teknik analisis dalam pemuliaan tanaman seperti identifikasi genotipe, keragaman genetik (Aboul-maaty & Oraby, 2019; Sari *et al.*, 2018) dan biologi molekuler yang berdasarkan pada hibridisasi molekuler atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup dan kualitas yang baik (Restu, 2012) sehingga isolasi dan pemurnian DNA menjadi langkah penting yang turut diperhatikan. Oleh karena kandungan metabolit sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda, maka setiap tanaman membutuhkan prosedur isolasi yang optimum agar diperoleh DNA genom yang sesuai dengan syarat kebutuhan dalam analisis molekuler. Keberhasilan ekstraksi DNA tergantung pada jenis tanaman atau jaringan tanaman yang digunakan (Sari & Murti, 2015). Metode ekstraksi yang sudah ada seringkali dilakukan modifikasi karena tidak mampu menghasilkan DNA yang berkualitas. Menurut Sika *et al.*, (2015), metode ekstraksi DNA genom yang telah ada diduga mungkin akan membutuhkan modifikasi untuk dapat efektif pada spesies tanaman lain dengan berbagai konsentrasi metabolit sekunder. Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang dikembangkan Doyle & Doyle (1990) telah banyak digunakan untuk ekstraksi DNA (Ribeiro *et al.*, 2007). Pada penelitian Sari & Murti (2015), penggunaan metode Doyle & Doyel (1990) untuk ekstraksi DNA daun sawo, tidak mampu menghasilkan DNA yang berkualitas. Demikian juga pada beberapa penelitian lainnya yaitu pada tanaman mulberry (Anuradha *et al.*, 2013); beberapa jenis tanaman berbiji seperti semangka yang digunakan pada penelitian Aboul-Maaty & Oraby, (2019) juga memodifikasi metode Doyle & Doyel (1990).

Rathnayake *et al.*, (2014) mengungkapkan, DNA dapat diekstraksi dari berbagai bagian tanaman, mulai dari biji, batang, dan daun. Daun adalah bagian yang paling banyak digunakan. Pada tanaman tahunan, penggunaan daun agak tua (*mature*) menjadi alternatif dari daun muda yang ketersediaannya tidak selalu ada (Rathnayake *et al.*, 2014), meskipun pada daun yang agak tua diketahui banyak mengandung metabolit sekunder dan polisakarida (Sari & Murti, 2015; Chathrath *et al.*, 2013; Anuradha *et al.*, 2013; Boso *et al.*, 2012; Porebski *et al.*, 1997), sedangkan jika menggunakan daun yang sangat muda maka kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan sangat rendah (Anuradha *et al.*, 2013; Small *et al.*, 2004). Metabolit sekunder tanaman tidak hanya akan mempengaruhi kualitas ekstraksi DNA genom tetapi juga reaksi PCR dan analisis genetik serupa lainnya (Kotchoni *et al.*, 2011; Sika *et al.*, 2015).

Polisakarida menjadi masalah jika dikandung dalam sampel DNA, karena dapat menghambat aktivitas enzimatis. Kehadiran polisakarida dalam sampel DNA telah terbukti menghambat aktivitas Taq polimerase dan aktivitas enzim restriksi. Adanya polisakarida dalam sampel DNA ditandai dengan pembentukan larutan yang sangat kental. Bentuk teroksidasi polifenol secara kovalen mengikat DNA menghasilkan warna coklat, sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis molekuler (Sahu, *et al.*, 2012).

Penggunaan DNA *extraction kits* banyak diminati karena dengan waktu yang relatif singkat sekitar 35 menit dapat menghasilkan DNA genom murni namun untuk kegiatan ekstraksi jumlah besar membutuhkan biaya yang juga besar karena harga kits yang sangat mahal (Amani *et al.*, 2011; Anuradha *et al.*, 2013). Menurut Lebas (2002), metode CTAB yang dimodifikasi lebih efisien dibandingkan dengan menggunakan Qiagen DNeasy *plant kit* berdasarkan hasil amplifikasi PCR ubi ungu (*Dioscorea sp.*).

Metode CTAB merupakan metode yang paling umum digunakan, dan merupakan metode yang paling banyak dimodifikasi (Xin & Chen, 2012), seperti penelitian yang dilaporkan Mace *et al.*, (2003), Flagel *et al.*, (2005), Reynolds *et al.*, (2004), Michiels *et al.*, (2003) yang memodifikasi metode ekstraksi Doyle & Doyle (1987). Metode CTAB banyak dipilih untuk optimasi ekstraksi DNA, karena umum digunakan untuk mengekstraksi tanaman yang tinggi polisakarida dan metabolit sekunder lainnya (Turaki *et al.*, 2017).

Kandungan metabolit sekunder dalam sel tanaman juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Menurut Landolino *et al.*, (2004), cekaman abiotik seperti kekurangan air dan nutrisi atau infeksi patogen dapat secara signifikan meningkatkan biosintesis dan akumulasi senyawa sekunder. Berdasarkan hal tersebut, menunjukkan setiap tanaman membutuhkan metode prosedur ekstraksi DNA yang sesuai agar diperoleh DNA genom yang berkualitas untuk dapat digunakan sebagai bahan dalam analisis molekuler. Pada artikel ini membahas secara komprehensif tentang komposisi ekstraksi DNA hasil modifikasi pada tahapan atau komposisi, uji kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan, tujuannya agar dapat memberikan informasi terkait metode ekstraksi DNA genom untuk tanaman yang tinggi polisakarida dan metabolit sekunder lainnya.

2. Metode Ekstraksi DNA dan Modifikasinya

Ketika melakukan optimasi metode ekstraksi DNA genom, sangat penting untuk memastikan kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Faktor yang dapat menjadi pertimbangan dalam pemilihan metode ekstraksi DNA antara lain waktu, biaya, potensi toksisitas, hasil, ketersediaan peralatan laboratorium dan persyaratan keahlian, serta jumlah sampel yang diperlukan (Chacon-Cortes & Griffiths, 2014). Selama kegiatan optimasi metode ekstraksi DNA, modifikasi prosedur umumnya terhadap komposisi larutan buffer lisisnya ataupun teknik

penanganan fisik dalam pemisahan DNA genom dari senyawa lain. Pada prinsipnya optimasi prosedur ini bertujuan melindungi DNA genom dari degradasi akibat senyawa sekunder yang dilepaskan ketika sel dihancurkan atau kerusakan akibat penanganan fisik (Milligan 1992). Pada dasarnya, terdapat 4 tahapan dalam ekstraksi DNA, yaitu:

1. Pemisahan/*lysis*, pada tahap awal ini DNA genom dipisahkan dari sel, melalui perombakan membrane sel dan mengeluarkan inti sel. Tahap ini penting diperhatikan, karena menentukan hasil DNA yang akan diperoleh nantinya. Proses lysis yang tidak efektif, mengakibatkan DNA masih berada di dalam sel.
2. Pengikatan/*binding*, tahap pengikatan DNA sehingga dapat terpisahkan dari protein lainnya.
3. Pencucian/*washing*, tahap pencucian DNA untuk terpurifikasi.
4. *Pelarutan/Elute*, tahap resuspensi dengan penambahan larutan buffer sebagai pelarut.

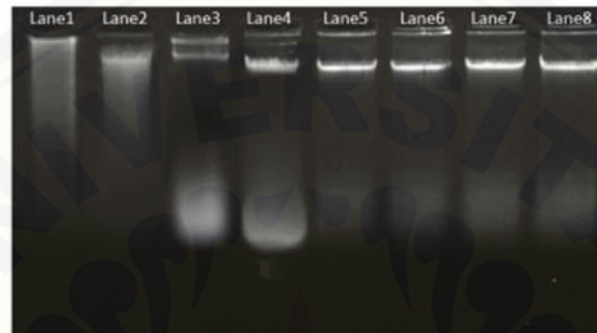
Tabel 1. Perkembangan Metode Ekstraksi DNA

Tahun	Metode	Penemu
1955	Size exclusion chromatography (SEC)	Lathe and Ruthven
1956	Ion-exchange chromatography (IEC)	Peterson and Sober
1957	EtBr-CsCl gradient centrifugation	Matthew meselson, Franklin W.Stahl, and Jerome Vinograd
1968	Affinity chromatography (AC)	Cuatrecasas and Wilcheck
1979	Alkaline extraction	Bimboim and Doly
1979	Silica matrices	Veigelstein and Gillespie
1988	Salting-out method	Miller et al.
1990	CTAB extraction	Doyle and Doyle
1998	Phenol-chloroform	Barker et al.
1998	Magnetic beads	Trevor Hawkins
2000	Whatman FTA Cards	Whatman,Inc
2011	Chelex-100 extraction	Xiong Hui, Xie Liquan, Chen Jiayi
2017	Filter paper-based method	Rui Shi and Dilip Panthee

Sumber: [Dairawan and Shetty \(2020\)](#)

Pada Tabel 1 disajikan perkembangan metode untuk ekstraksi DNA. Dari berbagai metode ekstraksi DNA salah satunya ialah yang dikemukakan [Doyle & Doyle \(1990\)](#) yaitu metode CTAB yang banyak diminati dan sering digunakan untuk ekstraksi DNA tanaman ([Ribeiro & Lovato, 2007](#)) yang mengandung polisakarida dan senyawa fenolik ([Jose & Usha, 2000](#)). Namun demikian, komposisi buffer CTAB tersebut tidak selalu sesuai untuk ekstraksi DNA tanaman, seperti sawo, murbei, cabai merah, papaya, jeruk sehingga perlu dilakukan modifikasi ([Sari & Murti, 2015](#); [Anuradha et al., 2013](#); [Nugroho et al., 2017](#); [Ardiana, 2009](#)). Alternatif lain untuk ekstraksi DNA ialah menggunakan ekstraksi DNA *kits*, meskipun mahal namun cukup banyak diminati ([Amani et al., 2011](#)), tentu hal tersebut disesuaikan dengan ketersediaan dana.

CTAB merupakan metode yang paling umum digunakan, dan merupakan metode yang paling banyak dimodifikasi (Xin & Chen, 2012). Menurut Sahu *et al.*, (2012), metode ekstraksi DNA CTAB dari Porebski *et al.*, (1997) dan Doyle & Doyle (1990), jumlah DNA yang diperoleh sangat rendah, dan kualitasnya juga buruk untuk sebagian besar sampel. Sedangkan, dengan metode CTAB Saghai-Marroof *et al.*, (1984) memberikan kuantitas DNA tanaman yang lebih baik, namun masih terdapat *smear/ pengotor*. Hasil optimasi Sahu *et al.*, (2012) menggunakan metode CTAB Saghai-Marroof *et al.*, (1984) dengan modifikasi konsentrasi TrisHCL, β -mercaptoethanol, NaCl, dan PVP memperoleh kualitas DNA yang lebih baik daripada 4 metode lainnya, seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. DNA genom yang dihasilkan dari ekstraksi daun tanaman dan disepari pada gel agarose 0.8%. Keterangan: Lane 1, Isolasi DNA menggunakan Kit (GeNei); Lane 2, Lane 3, dan Lane 4, isolasi DNA menggunakan metode CTAB Doyle & Doyle (1990), metode Porebski (1997), dan metode Saghai-Marroof (1984); Lane 5 hingga Lane 8, metode hasil modifikasi (Sahu *et al.*, 2012).

Pada Tabel 2 disajikan beberapa modifikasi metode CTAB untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi dari daun yang kaya metabolit sekunder. Modifikasi dengan penambahan antioksidan PVP (Polivinilpolipirolidone), β -mercaptoethanol, dan pemanfaatan nitrogen cair memudahkan penghancuran jaringan daun (Syafaruddin & Santoso, 2011). Modifikasi lainnya pada tahap ekstraksi dilakukan dengan pengulangan atau dengan memodifikasi volume, suhu, dan lama inkubasi (Chen *et al.*, 2010). Modifikasi ekstraksi DNA tanaman teh telah dilaporkan Dehestani & Tabar (2007), pada tanaman kemiri oleh Syafaruddin & Santoso (2011); dan pada tanaman jahe oleh Utami *et al.*, (2012). Namun, metode yang sesuai untuk tanaman tertentu belum tentu juga sesuai untuk jenis tanaman lainnya. Sari & Murti (2015), melakukan modifikasi metode CTAB Doyle & Doyle (1990) pada komponen buffer, pengulangan tahapan purifikasi untuk menghasilkan DNA genom sawo (*Manilkara zapota*) yang berkualitas.

Modifikasi pada komponen buffer CTAB, PVP dan β -mercaptoethanol mampu menghasilkan DNA yang berkualitas (Chathrath *et al.*, 2013; Sari & Murti, 2015). Fungsi dari β -mercaptoethanol ialah untuk menghilangkan polyphenol (Wilkins & Smart 1996), sejalan dengan

PVP yang akan mengikat komponen phenolic dan menekan oksidasi (Utami *et al.*, 2012). Penggunaan CTAB dalam buffer ekstraksi berguna untuk mengeliminasi polisakarida (Fang *et al.*, 1992). Sejalan yang diungkapkan Restu *et al.* (2012), buffer CTAB cukup memenuhi syarat untuk digunakan dalam ekstraksi DNA dari tanaman yang mengandung karbohidrat dan fenol tinggi karena tidak merusak DNA. Buffer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel, sedangkan PVP dapat mengurangi *browning* akibat kandungan fenol pada daun muda (Porebski *et al.*, 1997; Surzycki 2000).

Tabel 2. Komponen buffer dari metode CTAB yang dimodifikasi

Metode	Komponen buffer	Jenis tanaman yang digunakan	Sumber referensi
Modifikasi Doyle & Doyle (1990)	2,8% CTAB; 2,5M NaCl; 0,1M Tris-HCl; 0,02M EDTA; 3% mercaptoethanol; 2,5% PVP	Daun agak tua tanaman sawo (<i>Manilkara zapota</i>)	Sari & Murti (2015)
Modifikasi Doyle & Doyle (1990)	2% CTAB; 5mM L-ascorbid acid; 4mM DIECA; 1% Sodium Meta Bisulfate; 0,5% SDS; 1M Tris; 2% PVP; 0,5M EDTA; 33,3µl mercaptoethanol	Daun agak tua tanaman murbei (<i>Morus L.</i>)	Anuradha <i>et al.</i> (2013)
Modifikasi Metode Saghaimarroof <i>et al</i> (1984)	2% CTAB; 1,5M NaCl; 0,1M Tris-HCl; 0,02M EDTA; 1% mercaptoethanol; 2,5% PVP	Daun muda tanaman mangrove	Sahu <i>et al.</i> , (2012)
Modifikasi Metode Murray & Thompson (1980)	2% CTAB; 1,4M NaCl; 100Mm Tris-HCl; 20 Mm EDTA; 0,3% mercaptoethanol; 3% PVP	Daun muda dan daun agak tua dari tanaman <i>Flemingia macrophylla</i> , <i>Shorea robusta</i> , dan <i>Buchanania cochinchinensis</i>	Kumar & Kumari (2022)

Tabel 3. Modifikasi pada tahapan lysis dan purifikasi

Metode	Tahapan lysis dan purifikasi DNA	Sumber referensi
Modifikasi CTAB Doyle & Doyle (1990)	Nitrogen cair; 3x CIAA; 2x etanol 70%; RNase 1µl	Sari & Murti (2015)
Modifikasi CTAB Doyle & Doyle (1990)	Nitrogen cair; 3x CIAA; 2x etanol 70%; RNase 1µl	Anuradha <i>et al.</i> , (2013)
Modifikasi Metode Murray & Thompson (1980)	Tanpa nitrogen cair; 2x CIAA; 2x etanol 70%; RNase 10 µl	Kumar & Kumari (2022)

Pada Tabel 3 disajikan modifikasi metode pada tahapan lysis dan purifikasi dari beberapa penelitian. Peningkatan komponen buffer seperti CTAB, NaCl, β-mercaptoethanol dan PVP serta pengulangan CIAA (Chloroform Isoamyl Alcohol) dan etanol berpengaruh terhadap kualitas DNA sawo (Sari & Murti, 2015), selaras dengan hasil penelitian Chathrath *et al.*, (2013), yang juga

memodifikasi CTAB, PVP dan β -mercaptoetanol untuk menghasilkan DNA yang berkualitas. Penggunaan kloroform untuk menghilangkan polisakarida, lipid, dan zat nonpolar lainnya, sehingga dapat menghasilkan DNA yang lebih bersih (Richards *et al.*, 1994; Xin & Chen, 2012). RNAse juga dapat ditambahkan pada tahap purifikasi (Xin & Chen, 2012). Senyawa polifenol dan polisakarida yang tinggi pada daun bengkuang berhasil dihilangkan dari DNA yang diekstraksi menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi, melalui peningkatan konsentrasi PVP-40, natrium sulfat dan pengulangan presipitasi dengan natrium klorida Turaki *et al.*, (2017). Lebih lanjut Turaki *et al.*, (2017) mengungkapkan, konsentrasi PVP-40 yang digunakan dalam metode CTAB yang dimodifikasi serupa dengan yang digunakan Fang *et al.* (1992) dan Shankar *et al.*, (2011). Modifikasi pada komponen CTAB, PVP dan β -mercaptoethanol mampu menghasilkan DNA yang berkualitas (Chathrath *et al.*, 2013; Sari & Murti, 2015).

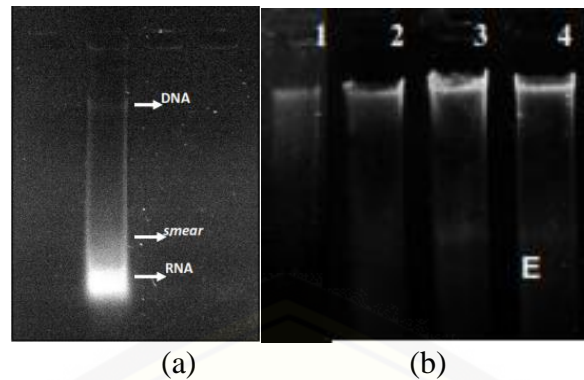
3. Pengujian Kuantitas dan Kualitas DNA

Pengujian kuantitas dan kualitas DNA genom yang dihasilkan dari metode ekstraksi yang digunakan penting artinya untuk mengetahui seberapa efektif metode yang digunakan dan seberapa banyak dan murninya DNA yang diperoleh. Kualitas kemurnian DNA dapat dikuantifikasi dengan menggunakan spektrofotometer. Kualitas DNA genom hasil ekstraksi yang sedikit kontaminan dari polisakarida, senyawa fenolik, dan protein ditandai dengan besar ratio A260/A230 nm senilai >2.0 dan pada ratio A260/A280 sebesar 1.8 - 2.0 (Sambrook *et al.*, (1989); Xin & Chen, (2012); Anuradha *et al.*, (2013); Sahu *et al.*, (2012). Menurut Fang *et al.*, (1992), DNA berkualitas ditunjukkan dari nilai ratio A260/A230 nm sebesar ≥ 1.8 menunjukkan DNA yang dihasilkan rendah polisakarida. Turaki *et al.*, (2017) dan Sambrook & Russel, (2001) menambahkan, jika nilai DNA pada rasio A260/A230nm sebesar ≤ 1.6 , menunjukkan tingginya kandungan polisakarida pada DNA yang dihasilkan.

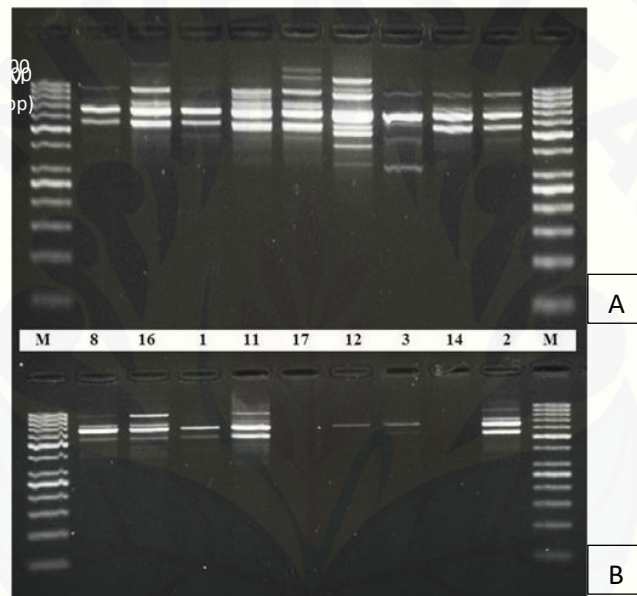
Pada Gambar 2 disajikan visualisasi kualitas DNA dari hasil modifikasi. Modifikasi DDM (Doyle & Doyle Method) untuk ekstraksi DNA sawo yang dilakukan Sari & Murti (2015), dengan penggunaan nitrogen cair, pengulangan tahapan CIAA, dan penambahan RNAase menghasilkan kemurnian DNA genom berkisar 1.75-2.0, sedangkan yang tanpa nitrogen cair, CIAA 1x dan tanpa RNAase menghasilkan DNA dengan kemurnian rata-rata 1.00-1.50.

Pada Gambar 2, kualitas DNA yang baik juga terlihat dari hasil elektroforesis yaitu tingginya intensitas pita DNA dan rendahnya intensitas *smear* (Utami *et al.*, 2012), dan hasil amplifikasi PCR menunjukkan pola pita yang jelas (Syafaruddin & Santoso, 2011). *Smear* dari DNA yang terfragmentasi tidak akan muncul dari DNA hasil ekstraksi yang memiliki kemurnian tinggi (Sahu *et al.*, 2012). Gambar 3, hasil penelitian Aboul-maaty & Oraby (2019) menunjukkan perbedaan visualisasi dari pola pita hasil PCR antara DNA yang diperoleh dari metode ekstraksi yang dimodifikasi dengan metode klasik/metode Doyle & Doyle (1990). Jumlah dan ketebalan

pita/bands dari alel lebih banyak pada DNA yang dihasilkan dari metode termodifikasi dari pada DDM.



Gambar 2. DNA genom yang dihasilkan dari ekstraksi daun tanaman sawo (A) Metode Doyle & Doyle (1990), (B) Hasil modifikasi DDM (Sari & Murti, 2015).



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR dengan RAPD primer (OPZ-09). Beberapa sampel DNA diekstraksi menggunakan metode dimodifikasi (A) dan metode DD klasik (B). M adalah molecular marker (50 bp) (Aboul-maaty & Oraby, 2019)

Telah dilaporkan Restu *et al.*, (2012) bahwa penggunaan β -mercaptoethanol dengan jumlah tinggi berhasil mengurangi polyphenols. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi tinggi β -mercaptoethanol dapat digunakan pada metode ekstraksi DNA untuk memperoleh hasil DNA yang berkualitas. Penambahan NaCl pada konsentrasi lebih dari 0.5M pada metode dengan CTAB, dapat mengurangi polisakarida (Moreira & Oliveira, 2011; Paterson *et al.*, 1993). Konsentrasi NaCl yang dibutuhkan dapat bervariasi antar spesies tanaman, kisarannya 0.7 sampai 6 M. Penambahan NaCl 1.5 M pada ekstraksi DNA yang dilakukan Sahu *et al.*, (2012) meningkatkan kualitas DNA Mangroves. Penggunaan PVP 2.5% juga dapat mempengaruhi kualitas DNA yang diperoleh (Sahu *et al.*, 2012). Couch & Fritz, (1990); Chaudhry *et al.*, (1999) juga merekomendasikan penggunaan PVP 2% untuk mengatasi penolik. Pola pita yang terdiferensiasi

dan bersih menunjukkan efisiensi dari protokol yang digunakan untuk menghasilkan DNA genom yang murni dan sesuai untuk digunakan pada teknik PCR (Devi *et al.*, 2013).

4. Kesimpulan

Metabolit sekunder tanaman dapat menjadi kendala dalam proses ekstraksi DNA. Kualitas DNA genomik dapat dilihat dari nilai rasio A260/230 dan A260/280, dan dari hasil visualisasi. Berbagai metode ekstraksi DNA dan modifikasinya telah dikembangkan. Tiap tanaman mengandung metabolit sekunder yang berbeda sehingga perlu dilakukan optimasi. Optimasi dari protokol ekstraksi yang ada dilakukan untuk memperoleh DNA genom murni. CTAB merupakan metode ekstraksi yang paling umum digunakan. Modifikasi pada metode CTAB umumnya melalui penambahan konsentrasi, pengulangan tahapan purifikasi, dan penambahan kemikalia. Penggunaan DNA kits dan nitrogen cair menjadi pilihan. Aspek yang menjadi pertimbangan dalam pemilihan metode ekstraksi DNA antara lain waktu, biaya, potensi toksisitas, hasil, ketersediaan peralatan laboratorium dan persyaratan keahlian, serta jumlah sampel yang diperlukan.

Daftar Pustaka

- About-Maaty, N.A. F., & Oraby, H.A.S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bull Natl Res Cent* 43, 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A. R., & Samanian, A. H. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian J. Biotech*, 9(1), 69-71 http://www.ijbiotech.com/article_7144_1146.html
- Anuradha, H., K. Vijayan, C. Nair, & A. Manjula. (2013). A Novel and Efficient Protocol for The Isolation of Genomic DNA from Mulberry (*Morus L.*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(2), 124-31 <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i2.11660>
- Ardiana, D.W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian* 14(1): 12-16.
- Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Martinez, M. C. & Kassemeyer, H.H. (2012). Quantification of Stilbenes in Vitis Genotypes with Different Levels of Resistance to Plasmopara viticola Infection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 419-423. <http://dx.doi.org/10.5344/ajev.2012.11127>
- Chathrath, P., Choudhary, M., & Tarafdar, A. (2013). An efficient protocol for genomic DNA isolation from field grown mature leaves of Pennisetum gluacum. *J. Biotecth.* 8(8), 30-34.
- Chaudhry, B., A. Yasmeen, T. Husnain, & S. Riazuddin. (1999). Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 1-7. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007629715971>
- Chacon-Cortes D. & Griffiths L. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2, 1-9. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573>
- Chen, H., M. Rangasamy, S. Y. Tan, H. Wang & B. D. Siegfried. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *Plos One*. 5(8), 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Couch, J. A., & Fritz, P. J. (1990). Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8 (1), 8-12. <https://doi.org/10.1007/BF02668875>

- Dairawan, M., and Shetty, P. J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *AJBSR.MS*, 8(1), ID.001234. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- Dehestani, A. & S. K. K. Tabar. (2007). A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian J. Plant Sci.* 6(6): 977- 981
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15. <https://worldveg.tind.io/record/33886/>
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Devi, K. D., Punyarani, K., Singh, N. S., & Devi, H. S. (2013). An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications. *SpringerPlus*, 2, 669. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-669>
- Fang, G. S., Hammer & Grumet, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13(1), 52-57. <https://europepmc.org/article/med/1503775>
- Flagel, L., Christensen, J. R., Gustus, C. D., Smith, K. P., Olhoft, P. M., Somers, D. A., & Matthews, P. D. (2005). Inexpensive, High Throughput Microplate Format for Plant Nucleic Acid Extraction: Suitable for Multiplex Southern Analyses of Transgenes. *Crop Sci.*, 45(5), 1985-1989. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2004.0657>
- Jose, J. & R. Usha. (2000). Extraction of geminiviral DNA from a high mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol.Biol.Rep.* 18:349-355. <https://doi.org/10.1007/BF02825062>
- Landolino, A. B., Goes DaSilva, F., Lim, H., Cho, H., Williams, L. E. & Cook, D. R. (2004). High-Quality RNA, cDNA, and Derived EST Libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 269-278. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02773137>
- Kotchoni, S. O., E. W. Gachomo, & J. C. Jimenez-Lopez. (2011). A plant cocktail amenable for PCR-based genetic analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Rep.*, 38, pp. 5281-5284 <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-011-0677-6>
- Kumar, A., & Kumari, K. (2022). Standardization of Genomic DNA isolation method from mature leaves and SSR-PCR conditions for *Flemingia semialata* an Alternative Lac Host Plant. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1572016/v1>
- Lebas B. S. M. (2002). Diversity of viruses infecting yams *Dioscorea* species in the South Pacific. Ph.D. thesis, *The University of Greenwich Chatham Maritime*, 157-181.
- Mace E. S, Buhariwalla H. K, & Crouch J. H. (2003). A high-throughput DNA extraction protocol for tropical molecular breeding programs. *Plant Mol Biol Rep.* 21, 459a-459h. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02772596>
- 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(1), 85-89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00665-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00665-6)
- Milligan, B.G. (1992). Plant DNA Isolation. In: A.R. Hoelzel (Ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. New York, US: Oxford University Press.
- Moreira, P.A., & D. A. Oliveira. (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 353–358. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr1030>
- Murray, M.G., & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8(19), 4321-4325. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Paterson, A. H., C. L. Brubaker, & J. F. Wendel. (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. <https://doi.org/10.1007/BF02670470>
- Porebski, S., L. G. Bailey, & B. R. Baum. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15(1), 8-15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Rathnayake, A. S., Allué, J., Llugany, M., Puig-Pujol, A., Hirimburegama, K. & Poschenrieder, C. (2014). High Quality DNA Obtained from a Single Seed of *Vitis vinifera* L. Using Rapid

- DNA Extraction Method. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2023-2030. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.513217>
- Reynolds, M. M., & Williams, C.G. (2004). Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome*. 47(5): 994-997. <http://dx.doi.org/10.1139/g04-045>
- Restu, Mukrimin, & Gusmiaty. (2012). Optimasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (Toona Sureni Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan RAPD. *Jurnal Natur Indoensia* 14(2), 138-142. <http://dx.doi.org/10.31258/jnat.14.1.138-142>
- Richards E, Reichardt M, & Rogers S. (1997). Preparation of genomic DNA from plant tissue. *Curr Protoc Mol Biol*. 1: 2-3.1 to 2.3.7. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0203s27>
- Ribeiro, R. A. & M. B. Lovato. (2007). Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res.* 6,173-187. <https://www.geneticsmr.com/sites/default/files/articles/year2007/vol6-1/pdf/gmr0278.pdf>
- Saghai-Marouf, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, & R. W. Allard. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 8014–8018. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- Sahu, S.K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. Vol 2012. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sambrook, J., & D. W. Russell. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari, V.K., & Murti, R.H. (2015). An Effective Method for DNA Extraction of Mature Leaf of Sapodilla (*Manilkara zapota* (L.) van Royen). *Agrivita* 37(1),18-23 <http://dx.doi.org/10.17503/Agrivita-2015-37-1-p018-023>
- Sari, V. K., Wulandari, R. A., & Murti, R. H. (2018). Study on Diversity of Sapodilla (*Manilkara zapota*) by Molecular Marker in the Special Region of Yogyakarta. *Agrivita*, 40(2), 295-303. <http://doi.org/10.17503/agrivita.v40i2.925>
- Shankar, K., Chavan, L., Shinde, S., & Patil, B. (2011). An Improved DNA Extraction Protocol from Four in Vitro Banana Cultivars. *Asian J. of Biotech.* 3(1), 84-90 <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.84.90>
- Sika, K. C., Kefela, T., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L., Saidou, A., Baba-Moussa, L. & Gachomo, E. W. (2015). A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. *Plant Gene*, 1, 43-45. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.001>
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg. New York, US: Springer-Verlag.
- Small, R. L., R. C. Cronn & J. F. Wendel. (2004). The use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 17(2), 145-170. <https://doi.org/10.1071/SB03015>
- Syafaruddin & Santoso, T.J. (2011). Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *J. Litri*. 17(1), 11-17. <http://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/1705>
- Turaki A. A., Ahmad B., Magaji U.F., Abdulrazak U.K., Yusuf B.A., & Hamza A.B. (2017). Optimised cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction method of plant leaf with high polysaccharide and polyphenolic compounds for downstream reliable molecular analysis. *African Journal of Biotechnology* 16(24), 1354-1365, <https://doi.org/10.5897/AJB2017.15942>
- Utami, A., Meryalita, R., Prihatin, N. A., Ambarsari, L., Kurniatin, P. A., & Nurcholis, W. (2012). Variation methods of DNA isolation from leaf of temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *In Proceedings of the National Conference of Chemistry*. Unesa, Surabaya (pp. 205-214).

- Wilkins, T.A. & Smart, L. B. (1996). "Isolation of RNA from Plant Tissue. Di dalam: Krieg, P.A. (ed). *A Laboratory Guide to RNA. Isolation, Analysis & Synthesis*". New York, US: Wiley – Liss.
- Xin, Z., & Chen, J. (2012). A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-26>

