

**Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada Reaksi *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br)
(Optimization of DNA and MgCl₂ Concentrations in *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* Reaction for Genetic Diversity Analysis of Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br))**

Uslan¹⁾, Made Pharmawati²⁾

¹⁾ Program Studi Magister Biologi, Program Pascasarjana Universitas Udayana, Jalan PB Sudirman, Denpasar, Bali

²⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Bali

*Email korespondensi: uslanspd@gmail.com

Diterima 12 Februari 2015, diterima untuk dipublikasikan 28 Februari 2015

Abstrak

Faloak merupakan tanaman yang tumbuh di lahan kritis. Sebagai upaya mendukung pemuliaan dan konservasi tanaman faloak diperlukan informasi keragaman genetiknya. Salah satu metode analisis keragaman genetik adalah menggunakan penanda DNA yang berbasis PCR. Untuk itu diperlukan kondisi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang tepat sehingga diperoleh hasil yang dapat dianalisis lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi optimum PCR-RAPD (*Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA*) tanaman faloak. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode CTAB. Optimasi dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi DNA cetakan dan MgCl₂. Kondisi optimum PCR-RAPD tanaman faloak yang menghasilkan pita produk PCR yang jelas diperoleh menggunakan 50 ng/ul DNA, 3 mM MgCl₂ serta jumlah siklus termal 45 x.

Kata kunci : PCR-RAPD, optimasi, tanaman faloak

Abstract

Faloak is a plant that grows on critical lands. In an effort to support breeding and conservation of faloak, information about its genetic diversity is required. One of the methods of genetic diversity analysis is using PCR-based DNA markers. For that purpose, proper PCR conditions is needed in order to obtain results that can be further analyzed. This study aimed to determine the optimum conditions for PCR-RAPD of faloak plants. DNA extraction was conducted using CTAB. Optimization was done by using several concentrations of DNA templates and MgCl₂. The optimum conditions of PCR-RAPD of faloak plants that produce clear band of PCR products were obtained using 50 ng/ ul DNA, 3 mM MgCl₂ and 45x thermal cycles

Keywords : PCR-RAPD, optimization, faloak plant

PENDAHULUAN

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) adalah tanaman yang tumbuh di lahan kritis. Sebagai upaya

mendukung pemuliaan dan konservasi tanaman faloak, diperlukan informasi keragaman genetik tanaman ini. Salah satu

cara melakukan analisis keragaman genetik adalah menggunakan penanda DNA. Penanda DNA yang umum digunakan adalah PCR-RAPD. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro* yang cepat dan kuat (Innis *et al.* 1990). *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu penanda molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun antarspesies (Pharmawati 2009, Adam *et al.* 2002, Jena dan Das 2006). Teknik ini mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak.

Penanda RAPD bersifat lebih sederhana dibandingkan penanda lainnya seperti mikrosatelit atau *simple sequence repeat* (SSR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) ataupun *amplified length polymorphism* (AFLP) (Bardakci 2001). Hal ini dikarenakan teknik RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan DNA genom organisme yang diuji maupun tidak memerlukan probe DNA yang spesifik (Williams *et al.* 1990). Konsistensi atau *reproducibility* hasil PCR-RAPD menjadi perhatian karena PCR-RAPD sangat sensitif terhadap konsentrasi komponen reaksi PCR (Pharmawati 2009). Rendahnya konsistensi hasil PCR-RAPD dapat disebabkan penempelan primer pada cetakan genom DNA tidak sempurna yang diakibatkan karena tidak tepatnya konsentrasi komponen-komponen PCR-RAPD. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan menentukan kondisi

optimal komponen reaksi PCR untuk analisis RAPD pada tanaman falok yaitu konsentrasi $MgCl_2$ dan DNA cetakan.

METODE

Ekstraksi DNA

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun falok diperoleh dari pekarangan dan hutan rakyat yang berada di wilayah Kota Kupang (Kecamatan Oebobo 3 sampel, Kecamatan Kelapa Lima 4 sampel, Kecamatan Maulafa 3 sampel, Kecamatan Alak 3 sampel) dan Kabupaten Kupang (Kecamatan Kupang Barat 3 sampel, Kecamatan Taebenu 2 sampel, Kecamatan Nekamese 2 sampel, Kecamatan Fatuleu 2 sampel). Isolasi DNA dilakukan dengan berdasarkan metode yang Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi (Pharmawati 2009) yaitu menggunakan 50 mM Na_2EDTA . Isolasi DNA dilakukan menggunakan 0,1 g daun yang digerus sampai halus dengan mortar dan pestle. Ditambahkan 1 mL buffer ekstraksi [2%CTAB, 1,4 M NaCl, 0.2% β -mercaptoetanol, 50 mM Na_2EDTA (pH 8,0) dan 100 mM Tris-HCL (pH 8,0)] yang telah mengandung 0,2% β -mercaptoetanol.

Hasil gerusan selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung mikro dan diinkubasi pada suhu 65°C pada *water bath* selama 60 menit disertai dengan membolak-balik tabung setiap 10 menit. Setelah itu ditambahkan 700 μ l kloroform: isoamilalkohol (24:1) dan divortex. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan etanol dingin sesuai dengan volume supernatan, lalu tabung dibolak-balik dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Tabung di disentrifugasi

pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit dan *pellet* dicuci dengan alkohol 70 % sebanyak 400 μ L. *Pellet* di kering anginkan lalu ditambahkan dengan 100 μ L H₂O steril.

Visualisasi dan Penentuan Konsentrasi DNA

DNA dielektroforesis dengan gel agarosa 1% dalam 1 x *buffer* TAE [40 mM Tris-asetat (pH 7,9) dan 2 mM Na₂EDTA]. Sebanyak 3 μ L sampel dicampur dengan *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Lambda DNA dengan konsentrasi 100 ng, 200 ng dan 300 ng dimasukkan ke dalam sumur gel, untuk memperkirakan konsentrasi DNA. Elektroforesis dilakukan dalam tegangan 100 volt selama 30 menit. Pewarnaan dilakukan dengan cara merendam gel dalam *Ethidium Bromide* selama 30 menit (Sambrook dan Russell 2001), selanjutnya pengamatan DNA dilakukan dengan GelDoc UV Transiluminator.

PCR-RAPD

PCR-RAPD dilakukan dengan menggunakan empat random primer (Tabel 1). Volume reaksi yang digunakan dalam analisis RAPD ini adalah 25 μ L yang terdiri dari cetakan DNA (dengan konsentrasi 50 ng dan 100 ng) 0,2 mM dNTPs, MgCl₂ (dengan konsentrasi 2 mM dan 3 mM) 1 U *Taq* DNA Polimerase (Vivantis), 1 x *buffer* polimerase, 1,9 μ M primer dan air steril. DNA dengan konsentrasi >50 ng/ μ L dibuat menjadi konsentrasi 50 ng/ μ L.

Program siklus termal dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit (sebanyak satu

kali), diikuti dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, annealing pada suhu 36°C selama 2 menit, elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit sebanyak 45 siklus. Tahap akhir adalah elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (sebanyak satu kali) (Wistiani 2014).

Hasil PCR dilakukan elektroforesis pada 1,8 % gel agarosa dengan voltase 100 volt selama 40 menit. Sebanyak 10 μ L produk PCR dicampur dengan *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Untuk menentukan ukuran pita DNA digunakan DNA *ladder* 100 bp (Vivantis). Pewarnaan dilakukan dengan cara merendam gel dalam *Ethidium Bromide* selama 30 menit. Pengamatan produk PCR dilakukan dengan GelDoc UV Transiluminator (Sambrook dan Russell 2001).

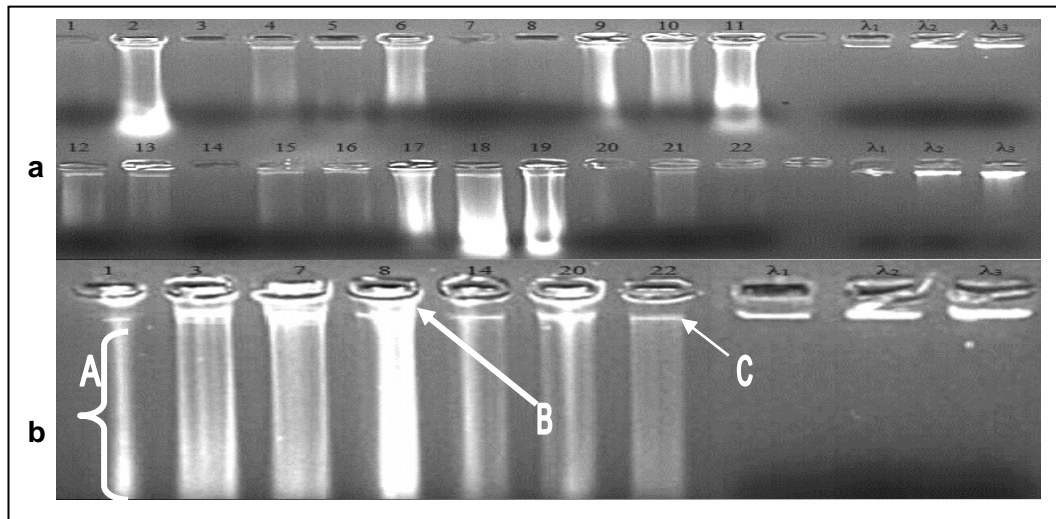
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA tanaman falok berhasil dilakukan dengan metode CTAB (Doyle dan Doyle 1990) dengan modifikasi oleh Pharmawati (2009). Modifikasi yang dilakukan adalah menaikkan konsentrasi Na₂EDTA dalam buffer ekstraksi menjadi 50 mM. Hal ini bertujuan untuk memaksimalkan keluarnya DNA dari sel sehingga DNA yang diperoleh dari tiap sampel secara konsisten.

Beberapa sampel tidak berhasil diekstraksi pada ekstraksi yang pertama (Gambar 1a), sehingga dilakukan pengulangan (Gambar 1 b). Ketidakberhasilan ini diakibatkan DNA tidak berhasil diekstraksi yang dapat disebabkan sampel daun yang digunakan terlalu sedikit atau proses penghancuran

Tabel 1. Primer yang digunakan dan urutan basa primer

No	Nama Primer	Urutan Basa (5' → 3')
1	UBC 106	CGTCTGCCCG
2	UBC 127	ATCTGGCAGC
3	UBC 250	CGACAGTCCC
4	OPB 04	GGACTGGAGT



Gambar 1. Profil DNA Genomik tanaman faloak (a) Isolasi DNA Genomik pertama, (b) Isolasi DNA Genomik Kedua. [Keterangan: DNA faloak sampel Kec. Oebobo (1-3), Kec. Kelapa Lima (4-7), Kec. Maulafa (8-10), Kec. Alak (11-13), Kec. Kupang Barat (14-16), Kec. Taebenu (17-18), Kec. Nekamese (19-20), Kec. Fatuleu (21-22), Lamda DNA 100 ng /2 μ L (λ_1), 200 ng/4 μ L (λ_2), 300ng/6 μ l (λ_3), Pita Smear (A), Sampel DNA Tertinggal di Sumur Gel (B), Pita DNA (C)].

melalui pengerusan yang kurang sempurna. Konsentrasi DNA genomik faloak berkisar antara 50-250 ng/ μ L. Beberapa hasil ekstraksi DNA pada elektroforesis terlihat *smear* dan juga sampel DNA sedikit tertinggal pada sumur gel pada saat elektroforesis.

Beberapa DNA genomik tanaman faloak hasil ekstraksi menghasilkan pita DNA yang disertai *smear*. Prayitno dan Nuryandani (2011) menyatakan pita *smear* pada bagian bawah pita DNA genomik merupakan molekul dengan bobot bervariasi yang berasal dari degradasi DNA. *Smear* mengindikasikan bahwa DNA

genomik yang diisolasi sudah tidak utuh lagi, kemungkinan terpotong-potong saat ekstraksi berlangsung (Sisharmini *et al.* 2001). *Smear* tersebut merupakan DNA yang terdegradasi pada proses isolasi, karena enzim endonuklease (Anam 2010). Adanya sampel DNA yang tertinggal di sumur gel pada saat elektroforesis menunjukkan tingginya kontaminan polisakarida yang ikut terekstrak (Pharmawati 2009).

Beberapa faktor berpengaruh pada keberhasilan PCR yaitu konsentrasi DNA cetakan, primer, MgCl₂ maupun jumlah siklus termal untuk menghasilkan pola-pola PCR-

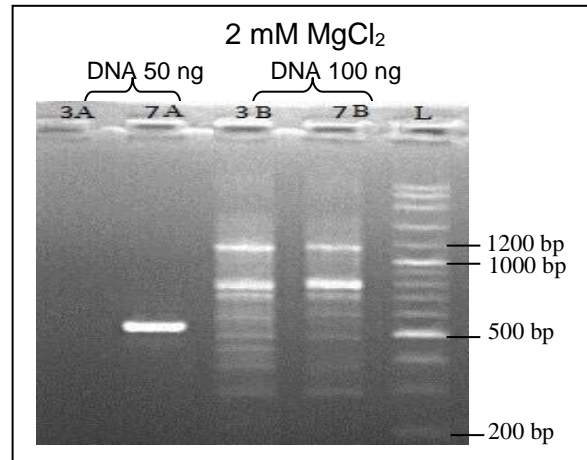
RAPD yang dapat dipercaya untuk analisis keanekaragaman dan hubungan kekerabatan (Pharmawati 2009). Konsentrasi magnesium merupakan faktor penting yang mempengaruhi kinerja *Taq* polimerase sehingga perlu ditentukan konsentrasi magnesium yang optimal. Dalam PCR-RAPD, konsentrasi magnesium mempengaruhi kualitas profil RAPD yang dihasilkan (Pharmawati 2009). Optimasi konsentrasi $MgCl_2$ dilakukan karena magnesium mempengaruhi penempelan primer serta aktifitas enzim (Padmalatha dan Prasad, 2006).

Konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh terhadap intensitas produk PCR-RAPD tanaman falok. Konsentrasi ion Mg^{2+} berpengaruh besar terhadap spesifisitas dan jumlah produk (*yield*) PCR. Pada umumnya jika ion Mg^{2+} kurang akan menurunkan *yield*, sedangkan jika ion Mg^{2+} berlebih akan menghasilkan produk non spesifik (Asy'ari dan Noer 2005). Pada penelitian ini, PCR-RAPD dengan konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM pada sampel 3A (Gambar 2) dengan primer UBC-106 tidak menghasilkan pita produk PCR. Amplifikasi DNA dengan primer UBC-106 dan UBC-127 menggunakan konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM dan DNA konsentrasi 50 ng dan 100 ng ditampilkan pada Gambar 2.

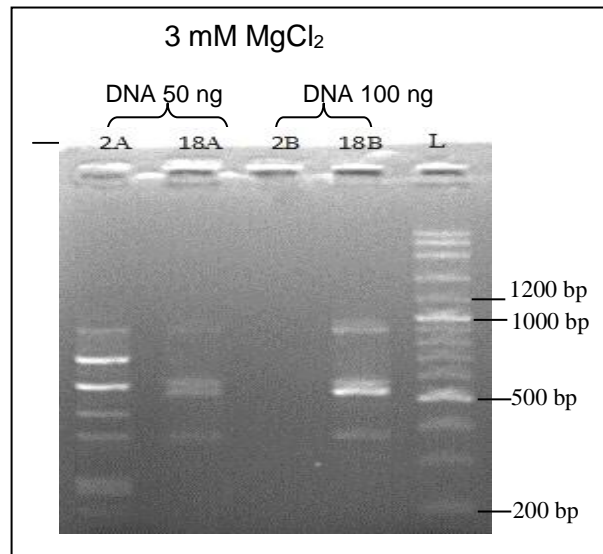
Pada konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM dengan primer UBC-250 mempengaruhi jumlah pita yang dihasilkan serta mengakibatkan

menurunnya intensitas pita tertentu (Gambar 3). Menggunakan konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM, banyak pita produk PCR yang muncul akan tetapi ada juga pendaran pita DNA yang kurang jelas yaitu pada sampel 18A (Gambar 3), sedangkan pada sampel 2B pita DNA tidak berhasil teramplifikasi (Gambar 3). Hasil PCR dengan konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM menggunakan primer UBC-250 dengan konsentrasi DNA 50 ng dan 100 ng disajikan pada Gambar 3.

Pola-pola hasil RAPD selain dipengaruhi oleh konsentrasi $MgCl_2$ juga dipengaruhi oleh konsentrasi DNA. Dari dua konsentrasi DNA yang digunakan untuk optimasi yaitu 50 ng dan 100 ng dengan tiga primer yang berbeda yakni UBC-106, UBC-127 (Gambar 2) dan UBC-250 (Gambar 3) dalam reaksi PCR, amplifikasi menghasilkan pita-pita produk PCR namun dengan kualitas yang berbeda. Pada konsentrasi DNA 50 ng PCR tidak menghasilkan pola pada primer UBC-106 dengan nomor sampel 3A (Gambar 2) sedangkan pada primer UBC-250 berhasil menghasilkan produk DNA yang jelas dengan panjang pita yang berbeda (Gambar 3 sampel 2A dan 18 A). Ketika konsentrasi DNA dinaikkan menjadi 100 ng, terdapat band DNA yang berhasil teramplifikasi dan ada yang tidak teramplifikasi. Penggunaan DNA konsentrasi 100 ng menghasilkan pita produk PCR yang jelas pada primer UBC-127 (Gambar 2 sampel 3B dan 7B) dan juga primer UBC-250 (Gambar 3 sampel 18B).



Gambar 2. Profil PCR-RAPD pada Konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM [Keterangan : Sampel DNA faloak Kec. Oebobo dengan Konsentrasi DNA 50 ng (3A), Kec.Kelapa Lima dengan Konsentrasi DNA 50 ng (7A), Kec. Oebobo dengan Konsentrasi DNA 100 ng (3B), Kec.Kelapa Lima dengan Konsentrasi DNA 100 ng (7B) Primer UBC-106 (A), Primer UBC-127 (B), DNA Ladder VC 100bp Plus (L)].



Gambar 3. Profil PCR-RAPD pada Konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM Menggunakan Primer UBC-250 [Keterangan : Sampel DNA faloak Kec. Oebobo dengan Konsentrasi DNA 50 ng (2A), Kec.Taebenu dengan Konsentrasi DNA 50 ng (18A), Kec. Oebobo dengan Konsentrasi DNA 100 ng (2B) dan Kec.Taebenu dengan Konsentrasi DNA 100 ng (18B), DNA Ladder VC 100bp Plus (L)].

Sedangkan untuk primer UBC-250 (Gambar 3 sampel 2B) pita PCR-RAPD tidak berhasil teramplifikasi.

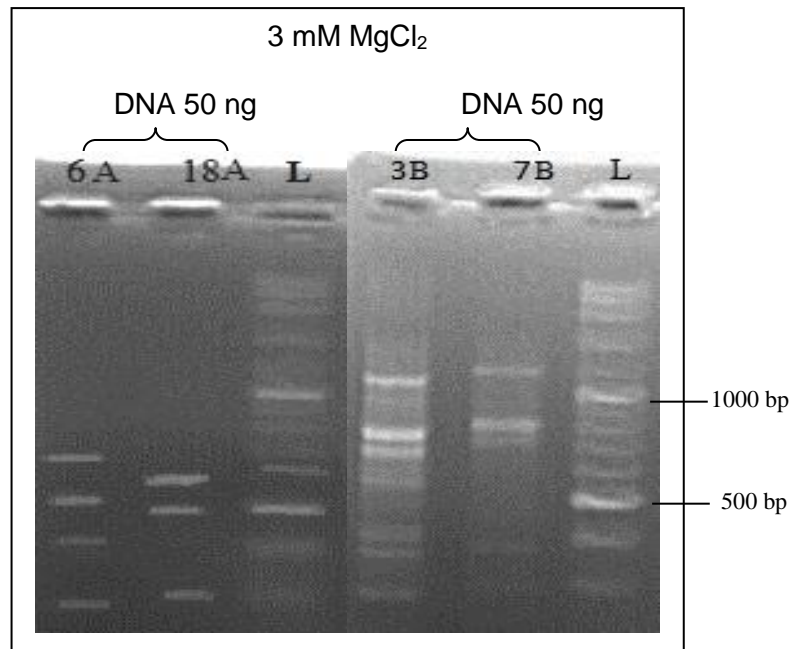
PCR-RAPD menggunakan konsentrasi DNA 50 ng/ul dan konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM pada primer

UBC-106 menghasilkan pita produk PCR yang jelas pada sampel DNA no 3 dan 7 (Gambar 4). Amplifikasi dengan primer OPB-04 menggunakan sampel DNA no 6 dan 18 (Gambar 4) juga menghasilkan produk yang jelas. Konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM dan konsentrasi DNA 50 ng/ul merupakan kondisi optimum dalam penelitian ini karena menghasilkan produk amplifikasi DNA yang jelas pada keempat sampel yang ditampilkan pada Gambar 4.

Konsentrasi DNA genom merupakan faktor penting dalam reaksi amplifikasi. Ukuran DNA yang kecil dapat mengurangi peluang penempelan primer kepada DNA cetakan. Demikian pula konsentrasi DNA yang terlalu tinggi dapat meningkatkan kontaminan yang mengganggu reaksi amplifikasi

(Chen 2000). DNA yang pemurniannya tidak sempurna kemungkinan masih mengandung polisakarida, senyawa fenolik atau kontaminan lain, sehingga konsentrasi DNA yang tinggi pada reaksi PCR akan meningkatnya konsentrasi DNA kontaminannya (Pharmawati 2009). Kontaminan dalam jumlah yang signifikan dapat mempengaruhi penempelan primer pada DNA cetakan (Weeden *et al.* 1992).

Dengan menggunakan kondisi PCR 50 ng DNA, 1,9 μM primer, 3 mM $MgCl_2$, serta jumlah siklus termal 45 siklus, diperoleh amplifikasi fragmen DNA yang optimum. Hasil ini dapat dimanfaatkan untuk karakterisasi molekuler maupun perbaikan genetik pada tanaman faloak.



Gambar 4. Profil PCR-RAPD pada Konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM menggunakan DNA Konsentrasi 50 ng/ μL . [Keterangan : Sampel DNA faloak Kec. Kelapa Lima (6), Kec. Taebenu (18), Kec. Oebobo (3), Kec. Kelapa Lima (7), Primer OPB-04 (A), Primer UBC-106 (B), DNA Ladder VC 100bp Plus (L)].

KESIMPULAN

Kondisi optimum untuk PCR-RAPD pada tanaman falok adalah menggunakan DNA dengan konsentrasi 50 ng/ul, dan MgCl₂ dengan konsentrasi 3 mM dengan jumlah siklus termal 45x.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam RP, Hsieh C, Murata J, Pandey RN (2002) Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem Sys Ecol* 30: 231–241
- Anam K (2010) Isolasi DNA genom. Bioteknologi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Asy'ari A, Noer AS (2005) Optimasi konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing pada proses amplifikasi multiframegment mtDNA dengan metode PCR. *JKSA* 8(1): 24-28
- Bardakci F (2001) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 25:185-196
- Chen HA (2000) Chen's own protocols: Chen's protocol list:PCR. (PCR online), [cited 2015 February.26]. Available From: <http://users.breathe.com/hachen/protocols/PCR.html>
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press Inc. New York
- Jena SN, Das AB (2006) Inter-population variation of chromosome and RAPD markers of *Suaeda nudiflora* (Willd.) Moq. a mangrove species in India. *African J Agric Res* 1: 137-142
- Padmalatha K, Prasad MNV (2006) Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African J Biotech* 5:230-234
- Pharmawati M (2009) Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea spp.* (Proteaceae). *Jurnal Biologi* 13(1): 12-16
- Prayitno E, Nuryandani E (2011) Optimalisasi ekstraksi DNA jarak pagar (*Jatropha curcas*) melalui pemilihan daun yang sesuai. *Bioteknologi* 8 (1): 24-31
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning (a laboratory manual). Volume 1, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Sisharmini, Ambarwati A, Santoso AD, Utami TJ, Herman DW (2001) Teknik isolasi DNA dan analisis PCR gen pinll pada genom ubi jalar. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman 2001. Bogor
- Weeden NF, Temmerman GM, Hemmat M, Kneen BE, Lodhi MA (1992) Inheritance and reliability of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. Dalam: Applications of RAPD technology to plant breeding. Crop Science Society of America, Madicon, WI. Symposium Proceedings, pp. 12-17

- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary promoters are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Wistiani LAJ (2014) Induksi mutasi kromosom dengan kolkisin pada tanaman Kesuna Bali (*Allium sativum* Linn.) dan analisis DNA dengan marka RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Tesis. Program Magister, Program Studi Ilmu Biologi, Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar