

Comparison of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsicum annum* L.) Plant DNA Isolation

Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum* L.)

Sri Octa Handayani, Dwi Hilda Putri*

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: dwiildaputri.08@gmail.com

Abstract. Chili (*Capsicum annum* L.) is the most popular horticultural commodity in Indonesia. This high level of interest must be accompanied by an increase in the quality and quantity of chili production. One way to increase the quality and quantity of chilies is through plant breeding. Genetic variation analysis is one of the success factors in plant breeding. DNA isolation is the first step in analyzing genetic variation. There are various methods of plant DNA isolation, but DNA isolation methods using the fenol-kloroform method and CTAB mini-prep have not been widely reported. In this study, a comparison of the DNA isolation method of chili plants was carried out with the least DNA acquisition and contamination. This study used accessions of *Capsicum annum* L. (Cibinong03). The results of the qualitative evaluation study on confirmation of DNA samples were that there were no DNA bands found in the 0.8% agarose gel electrophoresis results, this result was inversely proportional to the results of the CTAB mini-prep method which produced DNA band bands in chili accessions.

Key word: Chili, genetic variation, DNA isolation, fenol-cloroform, mini-prep CTAB.

Abstrak. Tanaman cabai (*Capsicum annum* L.) merupakan komoditas hortikultura yang paling banyak diminati oleh masyarakat Indonesia. Tingginya minat haruslah diiringi dengan meningkatnya kualitas dan kuantitas produksi cabai. Salah satu cara meningkatkan kualitas dan kuantitas cabai adalah dengan dilakukannya pemuliaan tanaman. Analisis variasi genetik merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam melakukan pemuliaan tanaman. Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam melakukan analisis variasi genetik. Terdapat berbagai metode isolasi DNA tanaman, tetapi metode isolasi DNA menggunakan metode fenol-kloroform dan mini-prep CTAB belum banyak dilaporkan. Pada penelitian ini dilakukan perbandingan metode isolasi DNA tanaman cabai dengan perolehan DNA dan kontaminasi paling sedikit. Penelitian ini menggunakan aksesori *Capsicum annum* L. (Cibinong03). Hasil penelitian evaluasi kualitatif pada konfirmasi sampel DNA adalah tidak ditemukannya *band* DNA pada hasil elektroforesis gel agarosa 0,8%, hasil ini berbanding terbalik pada hasil metode mini-prep CTAB yang menghasilkan *band* pita DNA pada sampel cabai.

Kata kunci: Cabai, variasi genetik, isolasi DNA, fenol-kloroform, mini-prep CTAB



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author.

Pendahuluan

Cabai (*Capsicum spp.*) berasal dari Amerika Tengah, tepatnya pada Bolivia dan merupakan salah satu komoditas sayuran utama dunia, dengan total luas tanam 3,7 juta hektar dan produksi 33,4 juta ton per tahun (FAOSTAT, 2011). Cabai (*Capsicum spp.*) termasuk pada *Solanaceae* family. Dalam genus *Capsicum*, terdapat 31 species dengan 5 species yang dikenal luas yaitu *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* dan *C. pubescens* (Moscone *et al.*, 2007). Cabai mengandung gizi seperti protein, lemak, karbohidrat, kalsium, fosfor, besi, vitamin, dan senyawa bioaktif, yaitu capsaicin, flavonoid, serta minyak esensial (Pawar *et al.*, 2011). Banyaknya manfaat cabai sehingga diperlukan peningkatan produksi cabai secara kualitatif dan kuantitatif dengan cara perakitan varietas unggul dengan melakukan pemuliaan tanaman (Purmaningtyas, 2019). Salah satu manfaat pemuliaan tanaman adalah mengendalikan karakter suatu tanaman adalah dengan upaya perbaikan genetic (Kurniawati *et al.*, 2017).

Berbagai teknik analisis biologi molekuler termasuk pemuliaan tanaman yang berdasarkan pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup dan kualitas yang baik (Milligan, 1992). Isolasi DNA genom adalah langkah awal dalam melakukan analisis genetika dan molekuler. Isolasi DNA adalah teknik yang digunakan untuk mendapatkan DNA murni, yaitu yang tidak terdapat protein dan RNA dari suatu sel dalam jaringan. Tahapan isolasi DNA yaitu preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA dari ekstrak sel dan presipitasi DNA (Jamilah, 2005). Sel tanaman memiliki membrane sel dan dinding sel yang kuat. Dinding sel tersusun atas polisakarida dan membrane sel terdiri dari ikatan protein dan lemak. Untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel, membran sel dan dinding sel harus dipecah. Pemecahan tersebut dapat secara mekanik, kimiawi dan enzimatis (Sambrook *et al.*, 1989). Isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, akan tetapi pada setiap jenis atau bagian tanaman dapat memberikan hasil yang berbeda dikarenakan senyawa polifenol dan polisakarida (Jamilah, 2005).

Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) merupakan metode yang paling umum dilakukan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Ardiana, 2009). Salah satu tanaman yaitu tanaman cabai. Metode CTAB akan menghasilkan pita DNA yang berukuran tebal dan dapat memisahkan DNA dari polisakarida yang disebabkan adanya perbedaan karakteristik kelarutan. Selain itu, juga diperoleh RNA dengan pita tipis yang terletak jauh berada di bawah pita DNA (Prasetyo, 2008).

Metode fenol-kloroform merupakan metode standar untuk ekstraksi DNA. Metode ini sudah jarang digunakan akhir-akhir ini dikarenakan menggunakan fenol yang memiliki sifat toksik (Barnum, 2005). Metode pada penelitian ini menggunakan larutan fenol (ribozol) yang sebelumnya banyak digunakan untuk ekstraksi RNA dan belum banyak literasi tentang metode ini digunakan untuk ekstraksi DNA.

Bahan dan Metode

1. Prosedur Penelitian

a. Metode Ribozol

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode fenol-kloroform. Ekstraksi dilakukan dengan menggerus 50 mg sampel daun dengan menambahkan 1000 µL ribozol (fenol) secara bertahap 200 µL dan 800 µL. Inkubasi sampel selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya tambahkan 200 µL *chloroform* dan bolak balik selama 15 detik. Kemudian inkubasi sampel selama 3 menit pada suhu ruang. Selanjutnya *centrifuge* sampel pada kecepatan 12000 rpm selama 15 menit disuhu 4°C. Setelah *centrifuge* supernatan dibuang. Tambahkan 0,3ml *ethanol absolute* dan dibolak balik. Inkubasi selama 3 menit pada suhu ruang. Selanjutnya *centrifuge* dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit di suhu 4°C lalu supernatan dibuang. Tambahkan 1 ml 0,1M *sodium citrate* 10%. Kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dibolak-balik setiap 5 menit. Selanjutnya *centrifuge* dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatant dibuang. Mengulangi pencucian DNA dengan menambahkan 1 ml 0,1 M *sodium citrate* 10%, inkubasi lagi selama 30 menit pada suhu ruang dan dibolak-balik setiap 5 menit. Selanjutnya *centrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang. Tambahkan *ethanol* 75% sebanyak 1 ml dan dibolak-balik lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya *centrifuge* dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit disuhu 4°C. Selanjutnya buang

supernatan, lalu keringkan DNA (pellet) selama 10 menit. Tambahkan 50 µL NaOH 8mM. Selanjutnya *centrifuge* pada kecepatan 12.000 xg selama 10 menit di suhu 4°C. Selanjutnya pindahkan supernatan ke *microtube* yang baru. Kemudian tambahkan TE sebanyak 50 µL.

b. Metode Mini-prep CTAB

Protokol yang digunakan untuk isolasi DNA adalah prosedur ekstraksi berbasis Mini-prep CTAB yang disederhanakan untuk isolasi DNA dikembangkan IRRI (IRRI, 1997). Tabung berukuran 1.5 ml disiapkan dan diberikan label sesuai nama sampel. Sampel daun dipotong menjadi potongan 2-3 cm dan sampel digiling dengan 670 µl buffer ekstraksi dan 50 µl 20% SDS. Campuran di *vortex* dan diinkubasi 15 menit pada *waterbath* suhu 65°C. 100 µl 5M NaCl ditambahkan dan dibalik perlahan sambil menggoyangkan dengan tangan untuk menahan sampel secara merata. Kemudian ditambahkan 100 µl CTAB serta 1 mg PVP (seujung spatula) dan diaduk rata dengan *vortex* 20 detik. Larutan lalu diinkubasi selama 15 menit pada *waterbath* suhu 65 °C. Selanjutnya larutan di *centrifuge* pada 12000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan pada tabung baru lalu ditambahkan 900 µl kloroform (kloroform:isoamyl alkohol = 24:1) dan di *vortex* hingga rata. Selanjutnya sampel di *centrifuge* pada 12000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan pada tabung baru dan ditambah 600 µl isopropanol dingin lalu dibolak-balik secara perlahan. Pada titik ini, DNA menjadi terlihat sebagai untaian putih dengan menjentikkan tabung beberapa kali dengan jari. Campuran kembali di *centrifuge* pada 12000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 200 µl etanol 70% kemudian di *centrifuge* pada 12000 rpm selama 5 menit. Kemudian etanol dihilangkan dan pelet dibiarkan dikeringkan selama 3 jam. Pelet kemudian ditambah 30 µl buffer TE 1X. Sampel DNA disimpan pada 20°

2. Analisis Data

Data hasil isoasli DNA pada kedua metode dievaluasi secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel agarosa 0,8%.

Hasil dan Pembahasan

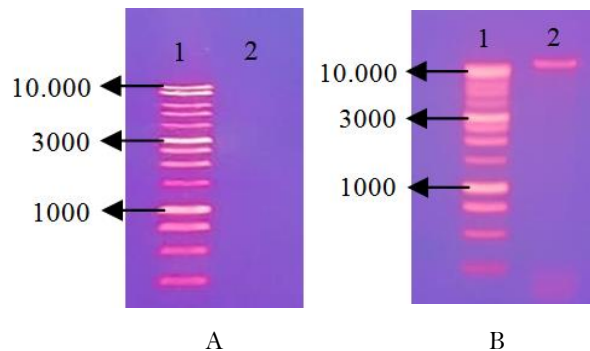
1. Metode fenol-kloroform

Untuk menghancurkan membran sel dan dinding sel pada metode ini dilakukan penggerusan bersama larutan fenol-kloroform. Dasar prinsip metode ini adalah menghilangkan kemampuan kelarutan protein sehingga protein akan mengendap sedangkan asam nukleat tetap larut. Molekul protein banyak mengandung residu asam amino hidrofobik. Fenol dapat membentuk suspensi berair memiliki misel fenol yang dikelilingi molekul air. Sehingga saat larutan terdapat protein terlarut yang dicampurkan dengan fenol (hidrofobik) menyebabkan protein membesar jadi terbuka serta terdenaturasi yang dikarenakan fenol yang berdifusi kedalam inti protein. Dampaknya, protein dipartisi ke fase fenol yang meninggalkan asam nukleat dalam fase berair. Asam nukleat tidak terdapat gugus hidrofobik sehingga tidak larut dalam fase fenol. kloroform digunakan sebab kloroform tidak larut dalam air sehingga menghindari hilangnya DNA ke fase organik. Deproteinisasi oleh kloroform didasarkan atas terdenaturasi rantai polipeptida pada interfase air - kloroform . Konsentrasi protein yang besar pada interfase hendak menimbulkan protein mengendap (Rini et al, 2018).

2. Metode mini-prep CTAB

Untuk menghancurkan membrane sel dan dinding sel pada metode ini ditambahkan buffer CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), SDS(*Sodium Deodesil Sulfat*), serta PVP(*Polivilpirolidone*). Buffer CTAB berfungsi melisiskan dinding sel dan membrane sel yang tersusun dari komponen lipid dan protein. Penambahan PVP juga dilakukan untuk mereduksi senyawa fenolik. Inkubasi pada suhu 65°C dalam *waterbath* saat proses ekstraksi berfungsi mengoptimalkan kerja buffer ekstraksi (Cheng *et al*, 2003). SDS adalah larutan detergen anion kuat berfungsi melarutkan lipid yang merupakan penyusun membrane sel, sehingga DNA akan terekspos keluar sel (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Untuk presipitasi dilakukan dengan menambahkan kloroform-isoamil alkohol untuk memisahkan DNA dari kontaminan. Kloroform merupakan pelarut organik yang melarutkan protein, lipid, dan molekul lain seperti polisakarida (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa konsentrasi 0,8% pada tangki berisi buffer TAE 1x dengan tegangan 110 Volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah UV *Transilluminator*. Hasil uji kualitatif tersebut disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji kualitatif menggunakan gel agarose 0,8%. Ket : (A) Metode Fenol-Kloroform (Ribozol), (B) Metode Mini-prep CTAB. Urutan sumur yaitu : sumur 1= Marker, sumur 2=Sampel.

Pada gambar 1. terlihat hanya metode mini-prep CTAB yang menghasilkan pita DNA. Pada hasil isolasi DNA menggunakan metode mini-prep CTAB terdapat *smear* tipis dibagian bawah. Menurut Sholihah (2014), *smear* pita DNA tersebut diduga disebabkan oleh pemipetan DNA berulang-ulang sehingga DNA akan terpotong. Kedua metode memiliki perbedaan pada buffer ekstraksi dan teknik ekstraksi, dimana metode fenol-kloroform menggunakan larutan kloroform dan fenol (ribozol) pada tahap ekstraksi sedangkan mini-prep CTAB menggunakan buffer CTAB dan SDS. Isolasi DNA menggunakan metode fenol-kloroform yang menggunakan larutan ribozol belum banyak dilakukan. Metode ini lebih banyak digunakan untuk mengisolasi RNA.

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui nilai konsentrasi dan kemurniaan sampel DNA agar larutan DNA dapat digunakan sebagai sampel cetakan PCR. Nilai kemurniaan DNA dapat ditentukan menggunakan perbandingan Optical Density (OD) larutan yang diukur dengan nanofotometer. Standar kemurniaan DNA diukur berdasarkan rasio OD A260/280 dan OD A260/230. Konsentrasi DNA diperoleh dari nilai berat DNA setiap 1 mikroliter. Hasil isolasi DNA mini-prep CTAB memiliki konsentrasi 100,65 ng/ μ l dengan nilai kemurniaan 2, 144. Menurut Sambrook *et al* (1989), hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/280 memiliki nilai antara 1.8 hingga 2.0. Namun, jika nilai kemurniaan berada pada 1.7 hingga 2.1, angka ini masih dapat diterima. Menurut Fatchiyah *et al* (2009), tingkat kemurniaan DNA diatas 2.0 dapat disebabkan karena terdapat sisa ethanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna ataupun terdapat sisa kandungan metabolit sekunder pada organ tanaman yang diekstrak.

Kesimpulan

Metode mini-prep CTAB dapat mengisolasi DNA cabai (*Capsicum annum* L.) aksesori Cibinong03 sedangkan metode fenol-kloroform (Ribozol) tidak dapat mengisolasi DNA cabai (*Capsicum annum* L.) aksesori Cibinong03.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih saya tujukan kepada dosen pembimbing atas saran dan masukan, selanjutnya terimakasih kepada semua pihak yang membantu terselesaikannya artikel ini.

Daftar Pustaka

- Ardiana, D.,W. (2009). Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Papaya dan Jeruk Dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB. Buletin Teknik Pertanian. Vol 14 (1): 12-16.
- Barnum, dan Susan, R. (2005). *Biotechnology an Introduction*, 2nd edition. USA : Thomson Brooks
- Cheng, Y., J., Guo, W.,W., Yi, H.,L., Pang, X., M and Deng, X. (2003). An Efficient Protocol for Genomic DNA Extraction From Citrus Species. Plant Molecular Biology Reporter. Vol 21: 177-177.

- FAOSTAT (2011) *Food and Agriculture Organization corporate statistical database*. [Online]. Available from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. [Accessed 20 Desember 2020]
- Fatchiyah, (2009). *Dasar-Dasar Teknik Analisa Biologi Molekuler*. Jakarta : Erlangga.
- IRRI. (1997). Makalah diskusi IRRI seri no. 22. POBox 933, Manila 1099, Filipina. 3 pp Kang HW, Yong GC, Ung han Y, Moo YE (1998). Metode Ekstraksi DNA Cepat untuk RFLP dan Analisis PCR dari Benih Kering Tunggal. *Tanaman Mol. Biol. Reputasi*. 16: 1-9.
- Jamilah. (2005). Pengaruh Berbagai Macam Detergen, Penambahan Enzim dan Ekstrak Nanas (*Ananas comusus* (L) Merr) Terhadap Hasil Isolasi DNA Berbagai Macam Buah Sebagai Topik Praktikum Matakuliah Genetika. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang : Universitas Negri Malang
- Kurniawati S & Hartati S. (2017). Optimasi Suhu Anneling Primer Degenerate Untuk Mengamplifikasi Fragmen Gen Arginie Decarboxylase (Adc) Genom Ubi Kayu Lokal Maluku Tenggara. *Ijobb*, 1(58-63).
- Milligan, B.,G. (1992). Plant DNA Isolation. In: A.R. Hoelzel (Ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabile M, Cecchini NM, Sanchez Garc Y, Jarret R, Davina JR, Ducasse DA, Barboza GE & Ehrendorfer F. (2007). The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum-Solanaceae*): A Cytogenetic Perspective. *Acta Hort*. 745: 70-137.
- Pawar, S. S., Bharude, N. V., Sonone, S. S., Deshmukh, R. S., Raut, A. K., & Umkar, A. R. (2011). Chillies as Food, Spice and Medicine: A Perspective. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(3) :311-318.
- Prasetyo, A. (2008). Karakterisasi Virus Pada Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L). *Skripsi tidak diterbitkan*. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- Purmaningtyas., O. D. Respatijarti. (2019). Heratibilitas dan Kemajuan Genetik Harapan Berdasarkan Karakter Agronomi Pada Aksesori Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Habitus Menyebarkan. *Jurnal Produksi Tanaman*, 7(1) :98-104.
- Rini, P., Chris, A., dan Solihin. (2018). *Genetika Molekuler dan Aplikasinya*. Jakarta : Universitas Negeri Jakarta.
- Sambrook, J., E.,F., Fritsch and T, Maniatis. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sholihah, S., M.(2014). Hubungan Kekerabatan Beberapa Kultivar Pisang (*Musa* sp.) untuk Sifat Ketahanan terhadap Penyakit Berdasarkan Resistance Gene Analog (RGA). *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Syafaruddin dan T.J. Santoso.(2011).Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif Pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco)). *Jurnal Littri*. Vol 17(1).