

Uji Efektivitas Metode Isolasi DNA Genom Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) Asal Kabupaten Jayawijaya

ARSYAM MAWARDI*, MARIA L. SIMONAPENDI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

Diterima: 18 November 2015 - Disetujui: 01 Februari 2016

© 2016 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Genetic substance of DNA has many functions as a basic component of the organism. DNA can be obtained directly through the isolation of DNA. Isolation of genomic DNA Wamena arabica coffee is done by treating the young leaves to get DNA extract. This research is intended to provide scientific contributions in an effort to screen the best methods of DNA isolation, including a modified extraction of Zheng *et al* method (2005), a modified method of Doyle and Doyle (1990), and method of George and Khan modification (2008) or CTAB method. All of methods were tested on Arabica coffee Jayawijaya Wamena. Testing was done by looking at the difference in quality and quantity of products in the form of genomic DNA concentration and DNA thickness, comparing with the marker DNA then electrophoresis on agarose gel. From the results of testing the effectiveness of three types of isolation methods, it was found that the method of George and Khan (2008) or CTAB genomic DNA produce the best quality than other methods. In terms of quantity, the criteria in the form of DNA concentrations ranging from 100 ng λ -DNA/ μ l, λ -DNA 50 ng/ μ l, λ -DNA 10 ng/ μ l. Concentration of genomic DNA bands visible when the profile is visualized in gel electrophoresis with UV luminescence. This study will be a step and initial information about the genetic composition of a population of arabica coffee which still exists, and will be developed through DNA amplification technique.

Key words: coffee, isolation of genomic DNA, CTAB method, profile band pattern.

PENDAHULUAN

Kopi di Wamena termasuk dalam kelompok kopi spesialti, yakni populasi Kopi Arabika yang di tanam pada daerah tertentu dan menghasilkan kopi dengan rasa dan aroma istimewa. Indonesia memiliki beberapa populasi kopi spesialti selain Wamena Coffee yang telah mempunyai nama di pasar internasional seperti Java Coffee, Gayo Mountain Coffee, dan Mandheling Coffee (SCAI, 2010).

Perkembangan bioteknologi modern di awal tahun 1970-an telah membuka cakrawala baru

dunia ilmu pengetahuan dan teknologi. Berbagai disiplin ilmu bergerak bersama dalam proses pengembangan teknik yang digunakan dalam penelitian biologi molekuler. Kajian aktivitas terpadu antar ilmu-ilmu biologi, biokimia, genetika, mikrobiologi, teknik kimia, komputasi, dan biofisika dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler untuk menghasilkan suatu barang dan jasa yang terkait dengan perkembangan IPTEK.

Pengenalan isolasi DNA sangatlah penting, mengingat bioteknologi pada akhir-akhir ini semakin maju. Terlebih untuk bidang biologi molekuler. DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologi seluruh bentuk kehidupan secara seluler. Isolasi DNA terhadap kopi arabika wamena dianggap penting sebagai

* Alamat korespondensi:

PS. Biologi, Jurusan Biologi, FMIPA Uncen.
Jl. Kamp. Wolker, Waena, Jayapura, Papua.
telp./fax.: +62967572115.
e-mail: mawardiarsyam@gmail.com

langkah awal dalam mengenali profil pita DNA. Namun, yang menjadi kendala adalah terkadang dalam melakukan isolasi DNA, ditemukan DNA yang memiliki kualitas dan kuantitas yang rendah. Hal tersebut dapat diketahui dari konsentrasi DNA-nya. Memang dalam perkembangannya yang semakin pesat, banyak alternatif metode untuk isolasi DNA. Melihat begitu banyak teknik dan metode untuk isolasi DNA, penelitian ini dianggap penting untuk memahami sekaligus dapat menentukan dengan tepat metode isolasi yang akurat dengan hasil maksimal untuk memperoleh substansi genetik pada daun kopi Arabika Wamena yang berasal dari Provinsi Papua.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Cenderawasih, pada tanggal 15 September hingga 3 Oktober 2015.

Tahap persiapan Sampel

Sampel diambil dari tanaman kopi arabika yang diperoleh dari perkebunan di kabupaten Jayawijaya, yakni distrik Wollo kampung Wollo, dan distrik Assolokobal. Organ yang diambil sebagai bahan analisis molekuler adalah daun muda tanaman kopi. Selanjutnya lembar daun muda disimpan dalam kondisi dingin pada suhu 4 °C (Lashermes, 2011). Selanjutnya sampel daun dibawa ke Laboratorium Biologi Universitas Cenderawasih.

Tahap Isolasi DNA

Pada tahapan ini, diaplikasikan berbagai teknik atau macam-macam metode isolasi DNA genom untuk melihat efektivitas dari masing-masing metode tersebut, diantaranya metode ekstraksi modifikasi Zheng *et al* (2005), metode modifikasi Doyle & Doyle (1990), dan metode modifikasi George & Khan (2008) atau metode CTAB. Hal ini akan sangat terkait kualitas dan kuantitas DNA genom yang diproduksi (Vieira, 2010).

Metode Ekstraksi Modifikasi Zheng *et al* (2005). Sampel daun 200 mg digerus hingga halus dan ditambahkan bufer ekstraksi (25 mM EDTA (pH 7,5), 50 mM TrisHCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, dan SDS 1%) sebanyak 400 µL dalam mortar dingin. Sampel ditambahkan 100 µL bufer ekstraksi di dalam tabung dingin dan ditambahkan 400 µL kloroform kemudian diinversi. Sentrifugasi dilakukan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Lapisan atas yang terbentuk ditambahkan 800 µL etanol absolut dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 1 jam. Sentrifugasi dilakukan 13.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4 °C. Endapan berupa pellet DNA ditambahkan 500 µL Etanol 70% dan disentrifugasi kembali. Pellet yang telah kering diresuspensi dengan 50 µL RNase serta diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Sentrifugasi 10000 rpm dilakukan selama 5 menit. Pellet kering ditambahkan 50 µL molecular water. Suspensi tersebut disimpan pada suhu -20 °C.

Metode Ekstraksi Modifikasi Doyle & Doyle (1990) dalam Diniz (2009) dengan Nitrogen Cair. Daun kopi sebanyak 1 gram digerus dengan PVP dan nitrogen cair hingga menjadi tepung. Sebanyak 10 mL bufer ekstraksi hangat dan 2,5 mL 2-merkaptotanol ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi sambil digoyang perlahan pada suhu 55 °C, kecepatan 150 rpm selama 1 jam. Selanjutnya diekstraksi ulang dengan kloroform : isoamil alkohol (24:1) sebanyak 10 mL. Selanjutnya, dilakukan pemisahan dengan sentrifugasi pada kecepatan 1000 g selama 5 menit. Aliquot yang terdapat pada bagian atas dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 2/ volume. Kemudian diinversi dan diinkubasi dalam es selama 30 menit. Pelet dikoleksi dengan sentrifugasi pada kecepatan 12000 g selama 20 menit. Pelet dicuci dengan bufer pencuci (etanol 76 % dan amonium asetat). Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 14000 g selama 10 menit. Pencucian dilakukan sebanyak 2 kali. Pelet yang telah dicuci selanjutnya ditambahkan dengan bufer TE dan ditambahkan RNase A dengan konsentrasi akhir 10 ug/mL. RNase A diaktivasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya, dipisahkan dengan sentri-

fugasi pada kecepatan 12000 g selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan diresuspensi dengan *molecular water*. Proteinase K ditambahkan dengan dua variasi penambahan.

Metode Ekstraksi Modifikasi prosedur George (2008) dan Khan *et al.* (2008) yang menggunakan teknik atau metode CTAB. Sampel daun yang telah didapatkan selanjutnya ditimbang 250 mg. Kemudian dipotong-potong kecil menggunakan gunting dan digerus bersama dengan 1,7 mL bufer ekstraksi (2% b/v CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 0,2% (v/v) 2- merkaptoetanol). Sampel digerus hingga halus, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung eppendorf dengan volume yang sama. Selanjutnya, dilakukan penambahan larutan 2-mercaptoetanol sebanyak 10 µl ke dalam tabung eppendorf di lemari asam, kemudian dipanaskan ke dalam *waterbath* dengan suhu berkisar 60–65 °C selama 60 menit. Setiap 15 menit tabung dibolak-balik, agar larutan tercampur merata.

Tabung didinginkan pada suhu ruangan selama 10 menit, kemudian ditambahkan chloroform-isoamylalkohol sebanyak 700 µl. Setelah itu, tabung diletakkan di dalam shaker selama 5 menit lalu dilanjutkan dengan sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 11600 rpm. Bagian supernatan DNA diambil dengan hati-hati dengan pipet mikro kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro steril (2 ml).

Langkah berikutnya, ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 700 µl pada tiap tabung. Tabung kemudian disimpan di dalam freezer -20 °C selama semalaman. Tabung yang telah disimpan semalaman dikeluarkan dari freezer. Tabung diputar-putar secara perlahan sampai muncul untaian benang berwarna putih. Kemudian tabung disentrifuse dengan kecepatan 11600 rpm selama 10 menit, hal ini dimaksudkan untuk mengendapkan pelet DNA pada dasar tabung. Cairan atas tabung dibuang secara hati-hati agar endapan DNA yang berada di dasar tabung tidak ikut terbuang.

Selanjutnya DNA dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 700 µl ke dalam tabung dan didiamkan selama 10 menit. Setelah itu, etanol di buang ke gelas beacker.

Pencucian dilakukan sebanyak dua kali agar kontaminan yang melekat pada DNA terbuang bersama etanol. Pelet DNA dikeringanginkan dengan cara membalik tabung yang berisi DNA di atas meja yang telah dialasi dengan kertas tissue.

Setelah DNA kering, ditambahkan TE bufer sebanyak 75 µl untuk melarutkan DNA. Kemudian dipanaskan di dalam *waterbath* dengan suhu 60 °C selama kurang lebih 1 jam atau hingga DNA telah menyatu dengan buffer. Tabung dimasukkan divortex selama 10 detik agar DNA yang berada di dinding tabung ikut menyatu ke bawah sehingga menjadi homogen. Dua Tabung DNA digabungkan menjadi satu, kemudian disimpan sebagai stok di dalam freezer.

Ketiga metode tersebut di atas melalui proses modifikasi dengan tujuan mendapatkan DNA genom dengan kualitas terbaik. Modifikasi dilakukan dengan variasi penambahan larutan seperti etanol 76%, bufer pencuci (etanol 76% dan ammonium asetat 3M), Proteinase K, RNase A, kalium asetat 5M, dan PVP. Modifikasi juga dilakukan dengan variasi penambahan larutan pada tahap yang berbeda dengan teknik yang beragam (Utami, 2012).

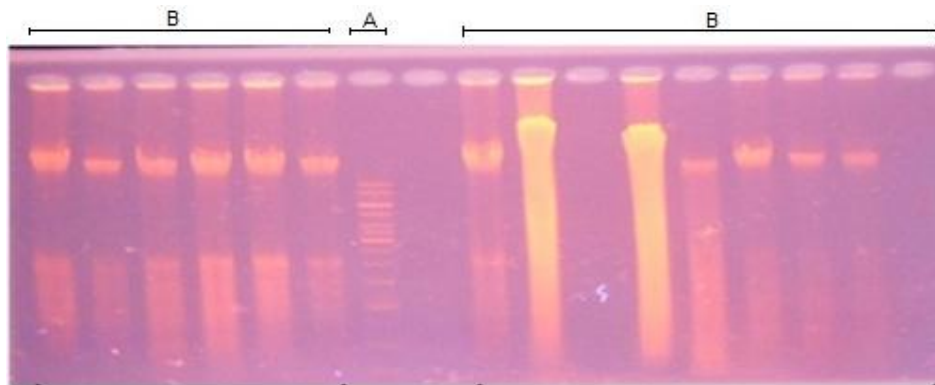
Teknik Pengumpulan data

Data pola pita diperoleh dan dikumpulkan dari uji kualitas dan kuantitas DNA. Untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA maka dilakukan pengecekan dengan menggunakan agarose 2 %, TBE 0,5M, sebagai media elektroforesis horizontal.

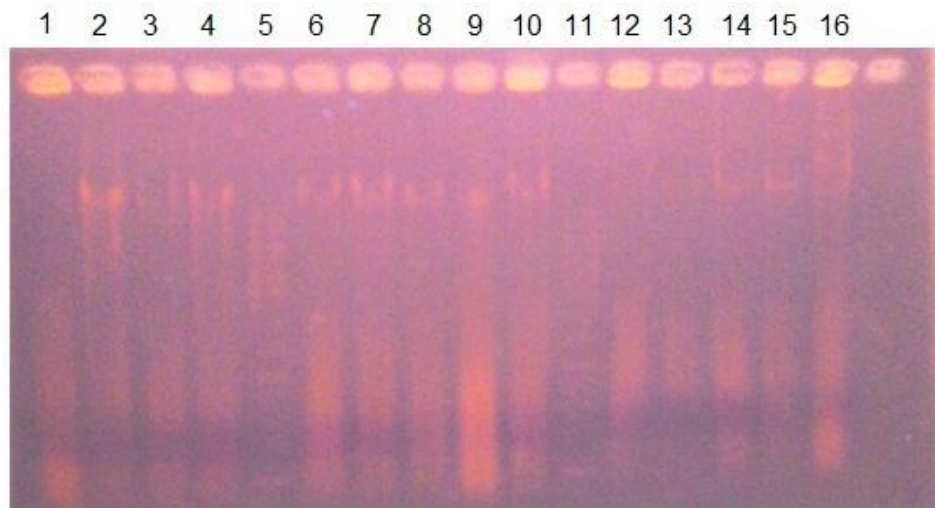
Pembuatan agarosa 2 % yang dipanaskan dengan *hot plate magnetic stirrer*. Gel tersebut nantinya secara hati-hati dimasukkan kedalam *Geldoc*, yang dilengkapi dengan cahaya UV dan visualisasi dengan kamera. DNA akan memunculkan pendaran akibat ethidium bromida. Konsentrasi DNA genom inilah yang menjadi data primer yang mendeskripsikan kualitas dan kuantitas profil pita.

Analisis Data

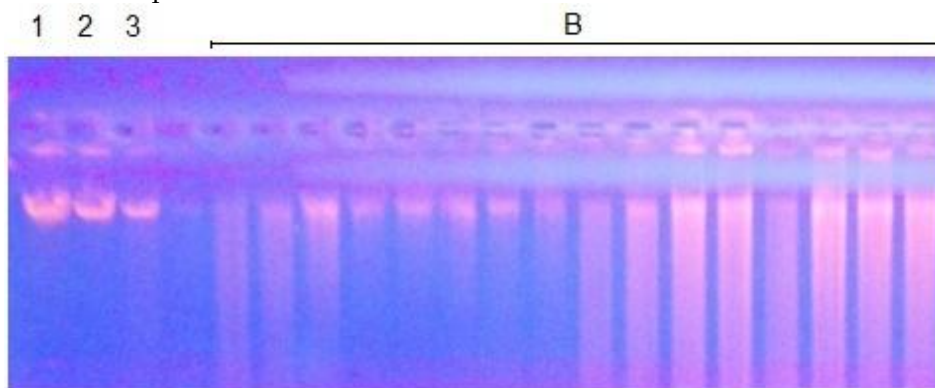
Hasil pemotretan berupa *band* (pita) DNA dianalisis dengan cara diterjemahkan dalam



Gambar 1. Gambar 1. Elektroforesis DNA genom kopi dengan gel agarose modifikasi Doyle. A: DNA marker/ ladder, B: sampel genotipe tanaman kopi.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA genom kopi dengan gel agarose modifikasi Zheng pada sampel genotipe tanaman kopi arabika.



Gambar 3. Elektroforesis DNA genom kopi dengan gel agarose modifikasi George & Kahn/CTAB. 1: λ-DNA 100 ng/μl, 2: λ-DNA 50 ng/μl, 3: λ-DNA 10 ng/μl, B: sampel genotipe tanaman kopi.

bentuk penyamaan konsentrasi DNA sampel yang diestimasi, DNA ladder dengan konsentrasi 100 ng/μl, 50 ng/μl, dan 10 ng/μl dijadikan sebagai

marker. Hal yang sama juga dilakukan terhadap masing-masing pengenceran DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dengan Metode Ekstraksi Modifikasi Doyle & Doyle (1990) dalam Diniz (2009) dengan Nitrogen Cair.

Berdasarkan hasil elektroforesis pada gel agarosa, terdapat beberapa sampel terdapat adanya pita tetapi *smear*. Hal ini menunjukkan bahwa isolasi DNA genom berhasil dilakukan tetapi kemurnian hasil isolasi DNA genom masih kurang baik, dapat disebabkan karena purifikasi DNA dengan kloroform : isoamil alkohol tidak sempurna sehingga masih terdapat kontaminan pada DNA. Fungsi dari kloroform : isoamil alkohol adalah untuk pemurnian DNA dari protein yaitu dengan cara mengendapkan protein. Selain itu juga dapat disebabkan karena pencucian DNA dengan etanol tidak sempurna sehingga pellet DNA masih mengandung isopropanol. Isopropanol berfungsi untuk pengendapan DNA, sedangkan etanol berfungsi untuk pencucian pellet DNA dari sisa isopropanol. Faktor lainnya adalah pelarutan DNA dalam TE-RNase tidak tepat sehingga DNA masih mengandung kontaminan RNA yang dapat menyebabkan *smear* pada saat elektroforesis. Fungsi TE-RNase adalah mendegradasi RNA yang mengotori DNA (Utami *et al*, 2012).

Hasil yang berbeda diperoleh untuk beberapa sampel lainnya, isolasi genom DNA belum berhasil dilakukan. Berdasarkan hasil elektroforesis pada gel agarosa, tidak terdapat pola pita. Hal ini dikarenakan pada saat pelet DNA dicuci dengan etanol absolut, pelet terlepas saat pembuangan etanol absolut dan pelletpun ikut terbuang. Selain itu, faktor-faktor yang dapat menyebabkan ketidakberhasilan tersebut adalah proses penggerusan sampel dengan penambahan nitrogen cair tidak sempurna sehingga DNA tidak terekstrak dengan baik.

Isolasi dengan Metode Ekstraksi Modifikasi Zheng *et al* (2005).

Berdasarkan hasil elektroforesis pada gel agarosa terdapat pita yang terlihat cukup jelas, namun ada beberapa yang *smear*. Hal ini menunjukkan bahwa isolasi DNA genom berhasil

dilakukan, proses isolasi dilakukan dengan tepat sehingga menghasilkan kemurnian DNA yang cukup baik.

Nampaknya kualitas dan kuantitasnya masih tergolong belum optimal, apalagi jika kita akan melangkah pada tahapan amplifikasi DNA yang menggunakan DNA genom hasil isolasi. DNA genom yang belum optimal akan berpengaruh terhadap produk amplifikasi DNA genom (PCR) nantinya.

Isolasi dengan Modifikasi prosedur George (2008) dan Khan *et al*. (2008) yang menggunakan metode CTAB

Hasil isolasi DNA kopi dengan metode CTAB (George dan Khan, 2008) menghasilkan larutan kompleks DNA kopi dengan kualitas dan kuantitas yang bervariasi. Kualitas DNA yang dihasilkan dalam penelitian ini ada dua, DNA yang terlihat seperti garis putih tebal yang memanjang ke bawah (*smear*), ini merupakan DNA yang kualitasnya kurang baik, dan DNA dengan kualitas yang baik terlihat seperti garis putih tebal, tidak memanjang dan berada pada sumur. DNA yang mengalami *smear* kemungkinan disebabkan oleh metode penggerusan sampel yang kurang baik, dan suhu yang tinggi pada saat pemanasan di atas waterbath.

Kuantitas DNA yang diperoleh bervariasi menunjukkan bahwa konsentrasi stok DNA tersebut sangat tinggi. Hal ini berarti metode yang digunakan untuk isolasi DNA pada tanaman kopi sudah tepat. Konsentrasi DNA ditentukan dari visualisasi DNA dengan membandingkan ketebalan dan luas permukaan pendaran DNA dibandingkan dengan standard yaitu λ -DNA sebagai pembanding. Konsentrasi dan kualitas DNA yang diperoleh juga banyak dipengaruhi oleh teknik ekstraksi yang digunakan, pengalaman dan tingkat keterampilan dalam menangani proses ekstraksi tersebut.

Pada gambar 3, tampak jelas kualitas DNA yang tidak sama diantara genotip, namun dari visualisasi fragmen-fragmen DNA pada UV transilluminator menunjukkan bahwa semua genotip yang dianalisis dapat teresolusi dengan baik.

KESIMPULAN

Perbedaan deterjen yang digunakan dalam isolasi DNA genom mempengaruhi tingkat pemunculan DNA dalam proses isolasi DNA genom kopi arabika. Ketiga prosedur isolasi DNA genom yang diuji efektivitasnya menunjukkan metode isolasi DNA genom George & Khan (2004) dengan CTAB terbukti efektif untuk mengisolasi DNA genom dari *Coffea arabica* L. varietas tipika asal Wamena Kabupaten Jayawijaya. Hal tersebut terbukti dari kenampakan profil pola pita (*band*) hasil visualisasi di atas transilluminator sinar ultraviolet. Metode ini disimpulkan sebagai metode terbaik karena secara konsisten menghasilkan produk materi genetik DNA genom dengan mutu yang bagus.

DAFTAR PUSTAKA

- Aga, E. 2005. *Molecular genetic diversity study of forest coffee tree (Coffea arabica L.) populations in Ethiopia: implications for conservation and breeding*. Swedish University of Agricultural Sciences. Alnarp. Sweden.
- Alatar, A.A., M.A. Mahmoud, S.A. Al-Sohaibani and K.A. Abd-Elsalam. 2012. Simple and rapid protocol for the isolation of PCR-amplifiable DNA from medicinal plants. *Genetics and Molecular Research*. 11(1): 348-354.
- Anonimous. 2010. *Perjalanan panjang Wamena Coffee*. P.T. Toarco Jaya. Makassar.
- Diniz, L.E.C., C.F. Ruas, V.P. Carvalho, F.M. Torres, E.A. Ruas, M.O. Santos, T. Sera and P.M. Ruas. 2009. Genetic diversity among 40 coffee varieties accessed by RAPD markers associated with restriction digestion. *Arq Biol tecnol*. 4: 511-521.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 10(1): 61-67.
- George, I.A. Khan, F.S. Awan, A. Ahmad and A.A. Khan. 2008. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 89a-89e.
- Lashermes, P., M.C. Combes, J. Cros, P. Trouslot, F. Anthony, and A. Charrier. 2011. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. *Asic Colloque Kyoto*. 6: 528-537.
- Hue, T.T.M., 2005. *Genetic variation in cultivated coffee (Coffea arabica L.) accessions New South Wales*. Australia.
- Silvestrini, M., M.G. Junqueira, A.C. Favarin, O.G. Filho, M.P. Maluf, M.B. Silvarolla and C.A. Colombo. 2007. Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian *Coffea arabica* L. accession using microstellit markers. *Genet Resour Crop Evol*. 54: 367-379.
- Specialty Coffe Association of Indonesia (SCAI). 2010. *Produksi dan pemasaran*. (<http://www.sca-indo.or/id>).
- Steiger, D.L., M. Noirot and R. Ming. 2007. AFLP Analysis of genetic diversity within and among coffea arabica varieties. *Theor Appl Genet*. 105: 209-215.
- Thieman, W.J., and A.P. Michael. 2013. *Introduction to Biotechnology*. Pearson: New York, USA.
- Utami A, R. Meryalita, N.A. Prihatin, L. Ambarsari, P.A. Kurniatin, and W. Nurcholis. 2012. Variasi metode isolasi DNA daun temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Prosiding Seminar Nasional Unesa*. Surabaya.
- Vieira, S.N., V. Pinho, M.G.G. Carvalho, D.G. Esselink and B. Vosman. 2010. Development of microsatellite marker for identifying Brazilian coffea arabica varietas. *Genetic and Molecular Biology online Ahead of print*. 20: 12-14.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Zheng, H., J. Zhang, J. Li, and S. Cai. 2005. Effects of mg²⁺ on supported bilayer membrane on a glassy carbon electrode during membrane formation. *International Journal of Electrochemical Science*. 2: 788-796.