

Research Paper

Isolasi DNA Pada Daun Jeruk (*Citrus sp.*) dengan Metode KIT

Lintang Kinanti Deandra A.S

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar

*Corresponding author: lintang21@gmail.com

ARTICLE INFO

Keywords
Isolasi DNA, *Citrus sp.*,
Kemurnian, Analisis
Molekuler

ABSTRACT

Isolasi DNA merupakan tahapan penting dalam analisis molekuler untuk memperoleh DNA genom murni yang dapat digunakan dalam penelitian lanjutan, seperti analisis keragaman genetik maupun amplifikasi PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA dari daun jeruk (*Citrus sp.*) menggunakan metode kit serta mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh. Tahapan isolasi meliputi persiapan sampel, lisis, pengikatan DNA, pencucian, dan elusi. Hasil penelitian menunjukkan variasi konsentrasi DNA pada setiap sampel dengan kisaran 176,689–558,302 ng/μl. Nilai kemurnian DNA (A260/A280) berada pada rentang 1,909–2,047, di mana sebagian besar sampel memenuhi standar kualitas DNA (1,8–2,0), meskipun beberapa sampel dengan nilai >2,0 mengindikasikan kemungkinan adanya kontaminasi protein. Temuan ini menunjukkan bahwa keberhasilan isolasi DNA sangat dipengaruhi oleh faktor homogenisasi jaringan, komposisi buffer, suhu, serta ketelitian dalam tahap ekstraksi. Penelitian ini memberikan kontribusi terhadap optimasi metode isolasi DNA pada tanaman jeruk yang dapat diaplikasikan pada analisis molekuler lebih lanjut.

Copyright © 2025 Authors

This is an open access article under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license



Introduction

DNA merupakan molekul genetik utama yang berfungsi sebagai penyimpan informasi biologis untuk pertumbuhan, perkembangan, dan metabolisme organisme. Pada tanaman, isolasi DNA menjadi langkah awal yang sangat penting dalam berbagai penelitian molekuler seperti analisis keragaman genetik, pemetaan gen, marker-assisted selection, serta rekayasa genetika (Setiawan dkk., 2021). Namun, isolasi DNA dari jaringan tanaman sering mengalami kendala akibat adanya metabolit sekunder seperti polisakarida, fenolik, dan pigmen yang dapat berikatan dengan DNA dan mengganggu proses pemurnian (Octavia dkk., 2021). Tanaman jeruk (*Citrus sp.*) merupakan salah satu tanaman hortikultura yang banyak mengandung senyawa metabolit sekunder sehingga proses isolasi DNA menjadi cukup menantang. DNA yang tidak murni dapat menyebabkan kegagalan pada tahap analisis lanjutan, misalnya pada PCR (Polymerase Chain Reaction) atau sekuensing (Triani, 2020). Berbagai metode isolasi DNA telah dikembangkan, di antaranya metode CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), hingga metode berbasis kit komersial. Metode kit lebih banyak dipilih karena lebih sederhana, cepat, dan umumnya menghasilkan DNA dengan kualitas baik (Wardana & Mushlih, 2021). Meski demikian, hasil isolasi tetap dipengaruhi oleh faktor-faktor teknis seperti homogenisasi jaringan, komposisi buffer, suhu dan lama inkubasi, serta keterampilan peneliti (Nugroho dkk., 2015).

Sejumlah penelitian sebelumnya telah melakukan isolasi DNA pada berbagai jenis tanaman dengan hasil yang bervariasi. Misalnya, Harahap (2017) melaporkan bahwa konsentrasi DNA sangat dipengaruhi oleh kecepatan ekstraksi dan tahap presipitasi. Sementara itu, Ramlah (2015) menemukan bahwa kontaminasi protein dapat menurunkan kualitas DNA hasil isolasi. Dengan demikian, setiap jenis tanaman membutuhkan optimasi metode isolasi yang sesuai dengan karakteristik jaringannya. Penelitian ini berfokus pada isolasi DNA daun jeruk menggunakan metode kit dengan tujuan mengevaluasi konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh, serta mengidentifikasi faktor-faktor yang memengaruhi keberhasilan isolasi. Keberhasilan penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pada optimasi metode isolasi DNA tanaman jeruk sehingga dapat mendukung penelitian molekuler lanjutan, khususnya dalam pemuliaan dan konservasi sumber daya genetik jeruk.

Method

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Universitas Tidar, pada 11 Juni 2024. Sampel berupa daun jeruk segar (pucuk ke-3 dari pucuk tertinggi). Alat yang digunakan antara lain mortar, mikropipet, tabung sentrifugasi, vortex, oven, kulkas/ice box, dan sentrifus. Bahan terdiri atas daun jeruk, alkohol 70%, larutan buffer (GP1, GPX1, GP2), RNase A, wash buffer, elution buffer, dan etanol. Prosedur isolasi dilakukan dengan tahapan:

1. Preparasi sampel: daun dicuci, dipotong kecil, digerus dengan mortar, ditambahkan buffer GP1.
2. Lisis: sampel ditambahkan buffer GPX1 + RNase A, diinkubasi 60°C, kemudian ditambahkan buffer GP2 dan diinkubasi dalam es.

3. Pengikatan DNA: campuran dipindahkan ke kolom GD, disentrifugasi, dan DNA terikat pada membran kolom.
4. Pencucian: dilakukan dengan W1 buffer dan wash buffer yang mengandung etanol.
5. Elusi: DNA dilepaskan menggunakan elution buffer yang dipanaskan.
6. Kualitas DNA dievaluasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260/280 nm.

Results and Discussion

Tabel 1. Hasil Penelitian DNA Daun Jeruk

Nama Sampel	Kemurnian (A260/A280)	Konsentrasi DNA
1	1.969	210.571
2	1.934	176.689
3	2.047	512.692
4	2.024	375.545
5	1.921	225.048
6	2.039	558.302
L	1.909	250.364
A	2.006	375.390

Sumber: (Data Primer, 2023)

Tiga proses utama dalam isolasi DNA yaitu: lisis dinding dan atau membran sel, pemisahan DNA dari senyawa lain, serta purifikasi DNA. Isolasi DNA dilakukan melalui tahapan-tahapan sebagai berikut: 1. Preparasi sel; 2. Lisis sel; 3. Pemurnian DNA dari penyusun sel yang lain; 4. Presipitasi DNA. Hasil dari proses ekstraksi DNA akan berbeda pada sampel makhluk hidup yang berbeda meskipun tahapan ekstraksinya sama. Untuk itu, pada masing-masing sampel bisa dilakukan optimasi di tiap-tiap tahapannya (Setiawan dkk., 2021). Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda sehingga membutuhkan prosedur isolasi yang optimal agar diperoleh DNA genom yang dapat digunakan sebagai bahan analisis molekuler salah satunya dalam analisis keragaman genetik seperti eksplorasi tumbuhan untuk keperluan data base bank DNA. Upaya optimasi prosedur tersebut dapat dilakukan terhadap komposisi larutan lysis buffer ataupun teknik penanganan fisik dalam pemisahan DNA genom dari senyawa lain sehingga dapat melindungi DNA genom dari degradasi akibat senyawa metabolit sekunder yang dilepaskan ketika lisis sel akibat penanganan isolasi.

Dasarnya beberapa faktor penentu keberhasilan dalam ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal dipengaruhi oleh penghomogenan jaringan tanaman, komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun atau jaringan tanaman sampel, dan penghilangan enzim penghambat polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan. Proses isolasi menjadi kunci tingkat kemurnian dan keberhasilan visualisasi pita DNA (Octavia dkk., 2021). Kualitas isolasi DNA dikatakan kurang baik apabila komponen pengotor (protein) tidak terdegradasi secara sempurna saat isolasi sehingga tercampur dengan DNA target dan adanya kontaminasi protein yang berasal dari komponen sel yang tidak lisis atau dari larutan fenol yang ditambahkan saat isolasi (untuk presipitasi DNA).

Beberapa teknik yang kemungkinan mengakibatkan terjadinya kontaminasi diantaranya yaitu kesalahan Teknik pengambilan supernatan yang kurang teliti dan hati-hati sehingga substansi yang tidak selain DNA ikut terambil, Proses digesti (pemotongan fragmen DNA) yang mungkin tidak sempurna karena selama inkubasi sampel tersebut tidak digoyang sehingga pada saat pengambilan fenol sebagian protein tidak ikut terikat dan tetap berikatan dengan DNA dalam sampel (Ramlah, 2015).

Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi proses isolasi DNA antara lain bagaimana memilih jenis jaringan yang akan digunakan dan umur jaringan tersebut, bagaimana menangani dan menyimpan jaringan tersebut sebelum diisolasi DNANYA, dan bagaimana melakukan homogenisasi jaringan tersebut, terutama pada jaringan tumbuhan yang dinding selnya banyak mengandung senyawa polisakarida. Terdapat tiga faktor penentu dalam proses ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal antara lain proses penghomogenan jaringan tanaman, komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun atau jaringan tanaman sampel dan penghilangan enzim penghambat polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan (Nugroho dkk., 2015).

Kemurnian DNA sangat dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan isolasi, salah satunya adalah pada proses pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi kedalam tabung eppendorf yang baru dan proses pengeringan isolat. Pemindahan supernatan harus dilakukan secara teliti agar jaringan-jaringan sel yang telah hancur dan berada di bagian bawah tabung tidak ikut terambil, sedangkan pengeringan DNA yang berupa pelet pada tahapan akhir isolasi harus benar-benar kering dari larutan sebelumnya yang dipakai untuk purifikasi. Jika pengeringan kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti alkohol dan etanol dapat menurunkan kemurnian DNA pada saat pengukuran spektrofotometer. Selain kemurnian DNA tinggi rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi DNA juga dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor lama waktu inkubasi, suhu yang digunakan, sumber DNA, merk kit yang digunakan serta keahlian peneliti dalam pengerjaan (Wardana dan Mushlih, 2021).

Faktor suhu inkubasi menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi konsentrasi. Setelah dilakukan pemecahan dinding sel, sampel dicampur dengan larutan lysis buffer dan diinkubasi pada suhu tertentu. Larutan buffer memiliki fungsi untuk menghancurkan jaringan dan membran sel, mengeliminasi kontaminan sehingga didapatkan DNA genom yang terdapat dalam sel berupa DNA inti. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka akan merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah, maka membran dan jaringan sel tidak dapat hancur. Larutan lysis buffer dapat bekerja dengan optimal pada suhu yang tidak terlalu rendah. Pemanasan suhu inkubasi yaitu 70 °C dan suhu dikurangi menjadi 65 °C setelah penambahan RNase. Faktor kedua yaitu lama waktu inkubasi, jika waktu yang digunakan terlalu lama maka dapat merusak DNA. Jika waktu yang digunakan terlalu sebentar maka tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel. Hal tersebut menjadikan bahwa penggunaan suhu dan waktu saat inkubasi diperhatikan dan diatur dengan baik. Kombinasi pengaturan suhu dan lama waktu inkubasi yang tepat akan didapatkan hasil konsentrasi isolat DNA sesuai dengan yang diharapkan, sehingga isolat DNA dapat digunakan untuk dilakukan tahapan selanjutnya seperti PCR (Ruchi dkk., 2018).

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa konsentrasi pada sampel pertama sebesar 210.571, pada sampel kedua 176.689, konsentrasi sampel tiga 512.692, konsentrasi sampel keempat 375.545, serta konsentrasi pada sampel kelima dan keenam masing-masing

225.048 dan 558.302. Sedangkan pada sampel L dan A yaitu sebesar 250.364 dan 375.390. Konsentrasi DNA akan berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah akan menghasilkan fragmen yang sangat tipis pada gel atau bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu fragmen dengan fragmen lainnya. Konsentrasi hasil ekstraksi DNA dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu kecepatan ekstraksi pada waktu ekstraksi dan komposisi penambahan lisis buffer. Faktor kecepatan ekstraksi merupakan faktor paling berpengaruh karena pada tahap lisis sel dan presipitasi pengambilan supernatan harus dilakukan per sampel, sehingga beberapa sampel terjadi pengendapan DNA (Harahap, 2017).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diketahui kemurnian DNA setiap sampel berbeda-beda. Hasil kemurnian DNA dilihat pada nilai A260/A280 atau dihitung dengan cara nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Sampel 1 didapatkan nilai 1,969, sampel 2 sebesar 1,934, sampel 3 sebesar 2,047, sampel 4 sebesar 2,024, sampel 5 sebesar 1,921, sampel 6 sebesar 2,039, sampel L sebesar 1,909, dan sampel A sebesar 2,006. Hasil kemurnian DNA yang berada pada rentang nilai 1,8-2,0 yaitu sampel 1, 2, 5, dan L, sedangkan sampel 3, 4, 6, dan A memiliki nilai diatas nilai 2,0. Sampel yang memiliki kemurnian dibawah 1,8 atau lebih kecil dari 1,8 menandakan adanya kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Pada. Jika nilai rasio A260/A280 lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya.

Hasil isolasi DNA dapat dikatakan murni apabila rasio absorbansinya berada pada 1,8-2,0. Nilai kemurnian DNA dihitung dengan cara nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Kemurnian DNA yang rendah pada pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dapat disebabkan oleh sampel yang digunakan saat pengukuran kurang homogen. Hal tersebut terjadi karena prinsip kerja dari spektrofotometri yaitu sampel harus jernih dan larut secara sempurna. Kemurnian DNA yang rendah juga dapat disebabkan karena penggunaan kuvet yang tidak jernih sehingga mempengaruhi hasil absorbansi sinar UV pada spektrofotometer. Kuvet yang digunakan harus terbuat dari bahan yang tidak menyerap radiasi, terutama pada bagian yang dilalui oleh sinar UV. Kuvet umumnya terbuat dari kaca yang tembus sinar namun terdapat juga kuvet yang terbuat dari plastik. Kuvet yang terbuat dari kaca lebih baik untuk digunakan pada Spektrofotometer UV-Vis karena kuvet yang terbuat dari bahan kaca silika dapat menyerap sinar ultraviolet. Sampel yang memiliki kemurnian dibawah 1,8 atau lebih kecil dari 1,8 menandakan adanya kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Jika nilai rasio A260/A280 lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Triani, 2020).

Conclusion

Penelitian ini berhasil mengisolasi DNA dari daun jeruk menggunakan metode kit dengan konsentrasi 176,689–558,302 ng/μl dan kemurnian 1,909–2,047. Sebagian besar sampel memenuhi standar kemurnian DNA (1,8–2,0), meskipun beberapa sampel menunjukkan nilai di atas 2,0 yang menandakan adanya kontaminasi Faktor-faktor yang

memengaruhi keberhasilan isolasi DNA meliputi homogenisasi jaringan, komposisi buffer, suhu serta lama inkubasi, dan teknik pengambilan supernatan. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar optimasi metode isolasi DNA tanaman jeruk untuk keperluan analisis molekuler selanjutnya.

References

- Harahap, A. S. (2017). Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatra. *Journal of Animal Science and Agronomy Panca Budi*, 2(12), 1–6.
- Nugroho, K., Rerenstradika, T., Terryana, & Lestari, P. (2015). Optimasi Metode Isolasi DNA pada *Jatropha* spp. *Jurnal Agroteknologi*, 5(2), 15–22.
- Octavia, D., Mukaromah, A. S., Martiansyah, I., Mimin, Ma'mun, S., & Rukmanto, H. (2021). Isolasi DNA Tumbuhan Hasil Eksplorasi di Nusakambangan dengan Metode Kit di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor. *Prosiding Biologi Achieving the Sustainable Development Goals*.
- Ramlah. (2015). Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jagung Lokal Tanah Toraja Berbasis SSR. *Skripsi*. UIN Alauddin Makassar.
- Setiawan, W. A., Handayani, K., & Kanedi, M. (2021). Pelatihan Analisis DNA secara Sederhana untuk Praktikum Biologi bagi Guru IPA SMA di Bandar Lampung. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*.
- Triani, N. (2020). Isolasi DNA Tanaman Jeruk dengan Metode CTAB. *G-Tech Jurnal Teknologi Terapan*, 3(2), 221–226.
- Wardana, A. C., & Mushlih, M. (2021). Perbandingan Kualitas DNA Template dengan Metode Kolom dengan dan tanpa Sentrifugasi. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 1–9.