

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara megabiodiversitas dengan kekayaan flora yang sangat tinggi, menempati urutan kedua di dunia setelah Brasil (Setiawan, 2022). Sebagai bagian dari kawasan tropis, Indonesia memiliki berbagai jenis tumbuhan bernilai ekologis dan ekonomis, salah satunya dari genus *Cinnamomum* (kayu manis). Tanaman ini tidak hanya dimanfaatkan sebagai rempah dan bahan obat tradisional, tetapi juga memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem hutan (Tanjung et al., 2024). Keberadaan *Cinnamomum sp.* di berbagai wilayah hutan Indonesia, termasuk Pulau Sulawesi yang merupakan bagian dari kawasan Wallacea dengan tingkat endemisme tinggi, menunjukkan pentingnya upaya konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik secara berkelanjutan. Upaya tersebut menjadi sangat penting karena kayu manis tidak hanya berfungsi sebagai komoditas bernilai ekonomi, tetapi juga berkontribusi terhadap kelestarian ekosistem hutan, sehingga manfaat ekologis dan ekonominya dapat terus dinikmati oleh generasi kini dan mendatang (Helmanto et al., 2021).

Kawasan PT. Vale Tbk di Desa Sorowako, Kabupaten Luwu Timur, merupakan salah satu wilayah dengan tingkat keanekaragaman hayati yang tinggi, termasuk keberadaan tanaman kayu manis (*Cinnamomum sp.*) yang tumbuh secara alami di kawasan tersebut. Menurut Data dan Status Kecenderungan Sumber Daya Keanekaragaman Hayati Tahun 2021–2025. Populasi *Cinnamomum sp.* di wilayah ini menunjukkan potensi sumber daya genetik yang penting untuk dikaji lebih lanjut, baik dari segi identifikasi, karakterisasi genetik, maupun upaya konservasinya. Hal ini menjadi dasar perlunya penelitian lanjutan menggunakan pendekatan molekuler guna memahami variasi genetik dan identitas spesies *Cinnamomum sp.* secara lebih akurat.

Kayu manis (*Cinnamomum sp.*) merupakan tanaman rempah bernilai tinggi dari famili Lauraceae yang memiliki potensi besar dalam berbagai bidang, seperti industri pangan, farmasi, dan kosmetik. Kandungan senyawa aktif seperti sinamaldehyd, eugenol, dan minyak atsiri menjadikan tanaman ini bernilai ekonomi sekaligus memiliki signifikansi biologis yang tinggi (Tafzi, 2019). Dari sudut pandang bioteknologi ekstraksi dan isolasi DNA diperlukan untuk memahami keragaman genetik, hubungan kekerabatan, serta kemampuan adaptasi terhadap kondisi lingkungan yang berbeda. Informasi tersebut menjadi dasar penting dalam mendukung program konservasi, pemuliaan tanaman, dan pengembangan sumber daya hayati secara berkelanjutan (Swetha et al., 2014).

Tahap isolasi DNA merupakan langkah awal yang penting dalam analisis molekuler tumbuhan karena kualitas dan jumlah DNA yang dihasilkan akan memengaruhi ketepatan analisis genetik, seperti RAPD, PCR, dan sekuensing. Isolasi DNA yang baik harus menghasilkan DNA yang murni dan utuh agar dapat

digunakan secara optimal untuk identifikasi spesies, studi kekerabatan, dan karakterisasi genetik (Restu et al., 2012). Namun, isolasi DNA pada tanaman tropis, termasuk *Cinnamomum* sp., sering kali menghadapi kendala akibat tingginya kadar metabolit sekunder yang dapat menghambat proses ekstraksi serta menurunkan kemurnian DNA (Sari & Restanto, 2022). Senyawa-senyawa tersebut dapat berinteraksi dengan DNA dan enzim selama proses isolasi, sehingga menyebabkan degradasi, pengendapan tidak sempurna, atau penghambatan reaksi enzimatik dalam tahapan berikutnya seperti amplifikasi PCR (Kumari et al., 2018). Oleh karena itu, diperlukan optimasi metode isolasi, misalnya dengan menambahkan bahan pengikat fenol, serta menyesuaikan suhu dan waktu inkubasi untuk mendapatkan DNA yang berkualitas baik (Nugroho et al., 2022; Sembiring et al., 2023).

Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) merupakan salah satu teknik isolasi DNA yang umum digunakan pada tanaman dengan kandungan metabolit sekunder tinggi karena kemampuannya memisahkan DNA dari senyawa pengganggu. Namun, efektivitas metode ini sangat dipengaruhi oleh kondisi jaringan, komposisi kimia tanaman, serta parameter seperti suhu dan lama inkubasi (Sembiring et al., 2023). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan metode isolasi DNA pada tanaman kayu manis (*Cinnamomum* sp.) melalui variasi waktu inkubasi (60, 120, dan 180 menit) yang dikombinasikan dengan tiga metode penggerusan berbeda, yaitu penggerusan biasa, penggerusan menggunakan buffer, dan penggerusan menggunakan silika pasir. DNA hasil isolasi selanjutnya digunakan untuk seleksi marka RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) guna menganalisis keragaman genetik *Cinnamomum* sp. Diharapkan penelitian ini menghasilkan DNA dengan kualitas, kemurnian, dan integritas tinggi yang layak digunakan dalam analisis molekuler, serta memperoleh marka RAPD yang polimorfik dan informatif. Selain itu, penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan metode isolasi DNA yang efisien dan efektif khususnya pada tanaman tropis seperti halnya kayu manis.

1.2 Landasan Teori

Indonesia adalah salah satu negara penghasil kayu manis (*Cinnamomum* sp.) yang berpotensi besar untuk diekspor, karena kayu manis merupakan tanaman yang sering dijadikan sebagai rempah-rempah masakan dan obat-obatan (Humaira & Rochdiani, 2021). Kayu manis diketahui memiliki kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, tannin, dan minyak atsiri sinamaldehyd (Mursyida & Wati, 2021). Bagian tanaman kayu manis yang paling banyak dimanfaatkan oleh masyarakat adalah kulit batangnya, sedangkan daunnya hingga saat ini belum dimanfaatkan secara optimal. Kulit batang, daun dan akar kayu manis diketahui memiliki khasiat sebagai antirematik, peningkat nafsu makan serta pereda nyeri (Astika & Farmasi, 2022). Selain dimanfaatkan sebagai komoditas rempah dan obat-obatan, kayu manis memiliki potensi penting dalam kajian genetika dan pemuliaan tanaman. Informasi genetik tanaman diperlukan untuk identifikasi spesies dan varietas, analisis keragaman genetik, konservasi sumber daya genetik serta

pengembangan varietas tanaman yang unggul (Xavier et al., 2022).

Kayu manis (*Cinnamomum* sp.) merupakan tanaman rempah dari famili Lauraceae yang banyak ditemukan di wilayah tropis dan subtropis. Tanaman ini memiliki karakteristik morfologi berupa pohon setinggi 5–15 meter dengan kulit batang berwarna coklat kemerahan muda dan aroma khas yang kuat (Wasia et al., 2017). Bagian tanaman yang paling umum dimanfaatkan adalah kulit batang sebagai bahan tambahan makanan dan minuman, sementara daun dan rantingnya mengandung minyak atsiri yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Secara biokimia, kayu manis kaya akan metabolit sekunder seperti tanin, polifenol, flavonoid, dan minyak atsiri yang berperan penting dalam aktivitas biologis maupun ketahanan tanaman (Fatmalia. N & Muthoharoh, 2017). Namun demikian, kandungan metabolit sekunder yang tinggi tersebut sering menjadi kendala dalam proses isolasi DNA karena senyawa fenolik dan tanin mudah teroksidasi dan berikatan dengan DNA, sehingga menurunkan kemurnian dan menghambat proses ekstraksi (Nugroho et al., 2022).

Isolasi DNA merupakan tahap awal yang sangat penting dalam studi genetika dan biologi molekuler karena menentukan kualitas hasil analisis berikutnya, seperti PCR, sekuensing, penanda genetik, dan manipulasi gen. Setiap jenis sampel memiliki kandungan kimia yang berbeda, sehingga diperlukan metode preparasi yang tepat agar diperoleh DNA yang utuh, murni, dan dalam jumlah cukup (Ainun et al., 2022). Proses isolasi DNA pada tanaman sangat dipengaruhi oleh komposisi kimia jaringan dan kandungan metabolit sekundernya. Senyawa fenolik, tanin, dan polisakarida dapat berinteraksi dengan DNA sehingga menyebabkan kontaminasi, penurunan integritas DNA, dan gangguan pada tahap pemurnian (Sari & Restanto, 2022). Isolasi DNA dengan kualitas tinggi merupakan hal yang mendasar dalam penelitian molekuler dan analisis keanekaragaman genetik. Salah satu permasalahan utama dalam proses isolasi DNA pada tanaman berkayu adalah kontaminasi polisakarida. Sampel DNA yang berasal dari tanaman berkayu sering terkontaminasi oleh polisakarida, senyawa fenolik, serta turunannya, yang dapat menurunkan kualitas DNA genom yang dihasilkan (Sundari, 2018).

Optimasi isolasi DNA sangat diperlukan terutama pada sampel yang mengandung banyak polifenol, polisakarida, resin, dan metabolit sekunder lain yang dapat menghambat PCR atau merusak DNA (Aboul-Maaty & Oraby, 2019). Salah satu metode yang secara luas digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman berkayu adalah metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Sundari, 2018). Metode ini efektif memisahkan DNA dari polisakarida dan protein, namun pada tanaman dengan kandungan fenolik tinggi, metode CTAB standar perlu dimodifikasi, misalnya dengan penambahan PVP (*Polyvinylpyrrolidone*), peningkatan β -merkaptopetanol, pengaturan suhu inkubasi, serta penggunaan pelarut kloroform-isoamil alkohol untuk meningkatkan kemurnian DNA (Doyle & Doyle, 1990; Putri et al., 2021). Optimasi metode ekstraksi diperlukan agar memperoleh DNA dengan kemurnian optimal—dapat dilihat melalui rasio absorbansi (A260/A280)—dan integritas pita DNA yang baik pada elektroforesis gel agarosa (Gree & Sambrook, 2012).

Keberhasilan optimasi isolasi DNA tidak hanya ditentukan oleh komposisi buffer ekstraksi, tetapi juga oleh jenis tanaman, kondisi sampel, serta tahapan perlakuan pra-ekstraksi (Khanuja et al., 1999). Selain itu, Tahap inkubasi selama ekstraksi DNA juga berpengaruh signifikan terhadap efisiensi lisis sel dan pelepasan DNA genom. Variasi waktu dan suhu inkubasi dapat memengaruhi kemampuan buffer CTAB dalam melisiskan dinding sel serta mengikat senyawa pengotor seperti polisakarida dan polifenol. Inkubasi yang terlalu singkat dapat menyebabkan DNA tidak terekstraksi secara maksimal, sedangkan inkubasi yang terlalu lama berisiko meningkatkan degradasi DNA. Oleh karena itu, pengaturan waktu inkubasi yang optimal menjadi aspek penting dalam pengembangan metode isolasi DNA tanaman berkayu (Healey et al., 2014). DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi yang teroptimasi selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk berbagai analisis molekuler, seperti amplifikasi gen menggunakan PCR, analisis keragaman genetik berbasis penanda molekuler serta filogenetik. Ketersediaan DNA dengan kemurnian dan integritas yang baik sangat penting untuk mendukung program pemuliaan tanaman, konservasi plasma nutfah, dan pengembangan varietas kayu manis unggul yang adaptif serta bernilai ekonomi tinggi (Nugroho et al., 2022).

DNA hasil isolasi selanjutnya dilakukan cek kuantitas dan kualitas untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan qubit 3.0 fluorometer dan elektroforesis Uji Kualitas DNA dilakukan dengan horizontal elektroforesis, pengecekan hasil isolasi DNA pada gel agarose (Harahap, 2018). Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul-molekul berdasarkan muatan listrik yang diaplikasikan pada molekul tersebut. Dalam konteks analisis DNA, elektroforesis digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan ukuran mereka. Salah satu aspek penting dalam analisis elektroforesis DNA adalah kualitas pita DNA yang dihasilkan. Kualitas pita DNA dapat diukur berdasarkan kecerahan atau intensitas pita yang terbentuk pada gel elektroforesis (Tanzil & Fanata, 2024). Sedangkan Parameter dalam mengukur kuantitas DNA dapat dilihat dari tingkat kemurnian. Tingkat kemurnian dapat diketahui melalui kuantitas DNA dari kontaminan yang ikut terisolasi. Adapun caranya yaitu dengan membagi nilai A260/280 (Tanzil & Fanata, 2024).

Penanda molekuler digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik di dalam dan antar populasi tanaman tanpa dipengaruhi oleh faktor lingkungan, sehingga memberikan informasi yang lebih stabil dan akurat dibandingkan penanda morfologi. Penanda molekuler seperti RAPD, SSR, dan SNP dimanfaatkan untuk analisis variasi genetik, pemetaan gen, dan hubungan kekerabatan, serta dapat dikombinasikan dengan teknologi genomik modern guna meningkatkan ketepatan dan efisiensi penelitian genetika tanaman (Dar et al., 2019). Primer merupakan sekuens DNA pendek berupa oligonukleotida beruntai tunggal dengan panjang sekitar 30 basa. Keberadaan primer dalam reaksi PCR memungkinkan terjadinya amplifikasi gen target selama proses PCR berlangsung. Primer berfungsi sebagai titik awal bagi enzim DNA polimerase untuk memulai sintesis untai DNA baru pada proses replikasi. Pemilihan primer sangat berpengaruh terhadap pita DNA polimorfik yang dihasilkan dalam analisis genetik, karena setiap primer memiliki lokasi penempelan yang

berbeda pada genom. Perbedaan lokasi penempelan tersebut menyebabkan setiap primer menghasilkan pola pita DNA yang bervariasi, baik dari segi jumlah pita maupun ukuran fragmen pasangan basa yang terbentuk (Gusmiaty et al., 2021).

Informasi awal seperti melakukan seleksi primer merupakan langkah pertama untuk mempermudah dalam melakukan studi genetika, karena primer yang terpilih akan menentukan keberhasilan amplifikasi DNA serta kejelasan pola pita yang dihasilkan dalam analisis RAPD. Seleksi primer RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dilakukan untuk menentukan primer yang mampu menghasilkan pola pita DNA yang jelas, konsisten, dan polimorfik pada proses amplifikasi PCR (Arsyad et al., 2022). Primer dalam RAPD merupakan *oligonukleotida* pendek yang berguna untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara acak. Primer yang dipilih akan menentukan pola pita DNA yang dihasilkan setelah elektroforesis gel agarosa, sehingga penting bagi primer untuk menghasilkan pita yang jelas, konsisten, dan *polimorfik* untuk membedakan antar *genotipe* atau spesies (Valencia-Ledezma et al., 2022). Penanda molekuler RAPD telah dimanfaatkan dalam autentikasi tumbuhan salah satunya karena faktor jumlah sampel yang digunakan sedikit dalam analisis dan tidak membutuhkan jaringan/sampel spesifik (Arsyad et al., 2022).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Koleksi sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil eksplorasi dan koleksi oleh Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juli 2025 di wilayah konsesi pertambangan PT Vale Tbk yang terletak di Desa Sorowako, Kabupaten Luwu Timur, Sulawesi Selatan. Tahap ekstraksi dan isolasi DNA dilaksanakan pada bulan Juli 2025. Selanjutnya, Uji kuantitas DNA dilakukan pada bulan Oktober hingga November 2025, diikuti dengan Uji kualitas DNA pada bulan Desember 2025. dan tahap seleksi primer dilaksanakan pada bulan Januari 2026. Seluruh tahapan penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Ekstraksi dan Isolasi DNA

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi **galah, alat tulis menulis, kamera dokumentasi, timbangan analitik, mikropipet dan tip, mikrotube, mortar dan pestle, spatula, gunting, vortex, freezer, centrifuge, water bath**, serta **rak tube**. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun *Cinnamomun* sp., plastik sampel, *teabag*, *silica gel*, aquades, alkohol, aluminium foil, Bufferbuffer CTAB, Bufferbuffer TE, Isopropanol, Klorofom, Klorofom Isoamil Alkoholisopropanol, klorofom, klorofom isoamil alkohol, Rneasy, Natrium Asetat, Latex, Spidolnatrium asetat, latex, spidol OHP, *Log Book*, dan Maskermasker.

2.2.2 Uji Kuantitas

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Qubit 3.0 flourometer, tube, mikropipet, mikrotube, rak tube dan tip. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu DNA murni sampel *Cinnamomun* sp., dan Promega (QuantiFluor™ ONE dsDNA Dye) dan Promega (QuantiFluor™ ONE dsDNA Dye).

2.2.3 Uji Kualitas

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi **elektroforesis, gelas ukur, gelas beaker, tube, mikropipet, mikrotube, timbangan analitik, tip mikropipet, rak tube**, dan **microwave**. Bahan yang digunakan yaitu DNA murni sampel *Cinnamomum* sp., Agaroseagarose dan Bufferbuffer TAE 1 X

2.2.4 Seleksi Primer

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi PCR (*Polymerase Chain Reaction*),

Elektroforesis, Timbangan analitik, Mikropipet, Tube, Tube PCR, Gelas Beaker, *Microwave*, *Gel Doc*, Latex, Komputer dan Plastik wrap. Bahan yang digunakan yaitu Primer RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), Mix Kappa, ddH₂O, Bufferbuffer TAE 1 X *DNA Working*, *RedSafe*, dan Leadder.

2.3 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja dalam penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yang saling berkesinambungan dan dirancang secara sistematis untuk memperoleh hasil yang optimal. Setiap tahapan memiliki tujuan dan fungsi tertentu dalam mendukung keseluruhan proses penelitian, mulai dari pengambilan sampel di lapangan hingga analisis data di laboratorium. Secara umum, alur kegiatan penelitian ini meliputi proses pengambilan dan persiapan sampel daun kayu manis (*Cinnamomun* sp.), dilanjutkan dengan tahap ekstraksi dan isolasi DNA menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi dengan 3 metode penggerusan berbeda yaitu penggerusan biasa, menggunakan Buffer CTAB dan menggunakan silika pasir yang dikombinasikan dengan lama waktu inkubasi 60, 120 dan 180 menit, kemudian dilakukan uji kuantitas DNA menggunakan **Qubit 3.0 Fluorometer** untuk mengetahui konsentrasi DNA yang diperoleh. Selanjutnya, dilakukan uji kualitas DNA melalui proses elektroforesis agar dapat memastikan tingkat kemurnian dan integritas DNA hasil isolas dan yang terakhir yaitu mengolah Data yang diperoleh dari hasil uji kuantitas. Alur lengkap tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 1, yang menggambarkan secara visual urutan kegiatan mulai dari tahap awal hingga analisis data akhir.



Gambar 1. Bagan alur penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil dari pohon Kayu manis *Cinnamomum* sp. yang tumbuh di dalam dan sekitar wilayah konsesi PT Vale Indonesia, Sorowako. dari setiap pohon diambil daun yang sehat sebagai bahan analisis. Pengambilan sampel mengikuti metode yang disarankan oleh (Li et al., 2020) yaitu memilih daun yang tidak terlalu muda pada bagian pucuk dan tidak terlalu tua, karena daun pada fase terlalu tua berpotensi mengandung senyawa pengganggu. Prosedur pengambilan sampel juga disesuaikan dengan teknik yang digunakan oleh (Semagn, 2022). Sampel daun diambil menggunakan galah, kemudian disemprot dengan alkohol 70% untuk menjaga kesterilan. Pengambilan sampel dilakukan pada beberapa titik lokasi, yaitu lokasi sampel 1 di Otuno (plot permanen), serta lokasi sampel 2 dan 3 di Gunung Batu. Daun yang telah dikumpulkan selanjutnya dimasukkan ke dalam kantong teh (*teabag*), kemudian ditempatkan dalam plastik sampel dan ditambahkan silika gel untuk mempertahankan kondisi, kesterilan, serta mencegah terjadinya pembusukan selama penyimpanan dan transportasi.

2.3.2 Ekstraksi dan Isolasi DNA

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang dikembangkan oleh Doyle dan Doyle tahun 1987 dan merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Farhanah et al., 2021). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (*lisis*), pemisahan DNA dengan komponen lainnya, serta pemurnian DNA

A. Prose Perusakan Dinding Sel (*Lisis*)

Tahap pertama dalam proses ini dimulai dengan menimbang sampel daun yang telah digunting dan dipisahkan dari tulang daunnya sebanyak 0,3 g, kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan pistil melalui tiga metode penggerusan yang berbeda, yaitu penggerusan biasa, penggerusan menggunakan buffer CTAB, dan penggerusan menggunakan silika pasir. Pada metode penggerusan menggunakan buffer, ditambahkan 500 μ L buffer CTAB secara bertahap selama proses penggerusan. Sementara itu, pada metode penggerusan biasa dan penggerusan menggunakan silika pasir, setelah proses penggerusan selesai ditambahkan 500 μ L buffer CTAB, kemudian sampel dihomogenkan menggunakan vortex selama 15 detik. Selanjutnya, sampel diinkubasi dalam water bath pada suhu 65 °C selama 60, 120, dan 180 menit mengacu pada penelitian oleh Smith dan Brown (2018). Selama proses inkubasi, sampel dihomogenkan menggunakan vortex selama 15 detik setiap 30 menit. Setelah inkubasi selesai, ke dalam sampel ditambahkan larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1) sebanyak 100 μ L, kemudian divortex selama 5 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian

dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 800 µL isopropanol, lalu divortex selama 5 detik. Sampel selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang, sedangkan endapan DNA yang terbentuk dikeringkan selama 24 jam. Penjelasan lebih rinci mengenai perbedaan perlakuan metode penggerusan dan lama waktu inkubasi pada setiap sampel disajikan pada tabel berikut.

Tabel 1. Perlakuan Metode Penggerusan dan Lama Waktu Inkubasi pada Sampel

Kode Sampel	Perlakuan Ekstraksi	Lama Waktu Inkubasi		
	Ekstraksi			
S1	Biasa			
	Buffer CTAB	60 menit	120 menit	180 menit
	Silika Pasir			
S2	Biasa			
	Buffer CTAB	60 menit	120 menit	180 menit
	Silika Pasir			
S3	Biasa			
	Buffer CTAB	60 menit	120 menit	180 menit
	Silika Pasir			

B. Proses pemisahan DNA dengan Komponen lainnya (*Precipitation*)

Tahapan yang pertama yang dilakukan yaitu menambahkan buffer TE 500 µl ke dalam tube yang telah dikeringkan kemudian divortex selama 5 detik lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Memindahkan supernatan ke tube baru kemudian ditambahkan kloroform 100 µl di vortex selama 5 detik lalu di sentrifugas dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Memindahkan supernatan ke tube baru kemudian ditambahkan natrium asetat 100 µl + isopropanol 800 µl di vortex selama 5 detik lalu disentrifugas dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Kemudian supematan dibuang dan endapan diambil lalu dikeringkan selama 24 jam.

C. Proses Pemurnian DNA

Tahapan selanjutnya yaitu pemurnian dimana tahap pertamanya yaitu menambkan buffer TE 1x, 100 µl ke dalam lube yang telah dikeringkan, menambahkan RNeasy 4 µl ke dalam tube yang berisi DNA total yang diperoleh, di vortex selama 5 detik lalu di sentrifugasi selama ± 15 detik. Hasil DNA master disimpan dalam freezer

2.3.3 Pengujian

A. Uji Kuantitas

Tahap awal pengujian dilakukan dengan menyiapkan seluruh alat dan bahan yang diperlukan. Sebanyak 200 µL QuantiFluor™ ONE dsDNA Dye dimasukkan ke dalam

mirotube 0,5 mL, kemudian tabung dibungkus dengan aluminium foil untuk mencegah paparan cahaya. Selanjutnya, ditambahkan 2 µL DNA standar sebagai larutan kalibrasi alat Qubit 3.0 fluorometer. Campuran tersebut diinkubasi di tempat gelap selama 5 menit, kemudian dilakukan pengukuran untuk menentukan konsentrasi DNA. Prosedur pengujian sampel dilakukan dengan langkah yang sama seperti pada tahap kalibrasi, dengan perbedaan pada penggunaan DNA sampel sebagai pengganti DNA standar.

B. Uji Kualitas

Pembuatan gel agarosa dilakukan dengan konsentrasi 0,8%. Bubuk agarosa sebanyak 0,72 g dilarutkan dalam 90 mL larutan buffer TAE 1X, kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* selama 4–5 menit hingga larutan homogen. Setelah itu, larutan agarosa ditambahkan pewarna DNA *RedSafe* dan dihomogenkan secara perlahan, kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel dan didiamkan selama 15–20 menit hingga mengeras. Gel agarosa yang telah mengeras selanjutnya ditempatkan dalam alat elektroforesis yang telah diisi dengan larutan buffer TAE 1X hingga seluruh permukaan gel terendam. Sampel DNA kemudian dicampur dengan loading dye dan dimasukkan ke dalam sumuran gel. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diambil dan divisualisasikan menggunakan UV transiluminator atau gel documentation system untuk mengamati pita DNA yang terbentuk.

C. Seleksi Primer

Pemilihan primer dilakukan untuk menyaring primer yang tidak mampu mengamplifikasi DNA pada sampel yang diuji. Proses ini dilakukan dengan menjalankan beberapa reaksi PCR menggunakan berbagai primer yang berbeda pada sampel DNA yang sama dan dalam kondisi PCR yang dibuat seragam. Tujuannya adalah untuk mengetahui primer yang bekerja paling baik serta melihat variasi pita DNA yang dihasilkan oleh masing-masing primer (Gusmiaty et al., 2021). Seleksi primer dilakukan dengan menggunakan mesin PCR yang memiliki 12 gradien suhu, guna untuk melihat suhu keberapa sampel tersebut teramplifikasi. Satu kali pengoperasian PCR terdiri dari 3 µl DNA *working*, 3 µl ddH₂O, 6, 25 µl PCR Mix 1, 25 µl primer RAPD. Untuk setiap reaksi yang menggunakan primer RAPD total reaksi 10,5 µl. Berikut data primer yang akan diseleksi

Tabel 2. Primer yang diseleksi

No	Nama Primer	Sequence	TM (°C)
RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)			
1	OPA 11	5' - CAA TCG CCG T - 3'	32

2	PLC 14	5' - TGC GTG CTT G - 3'	32
3	PLB 10	5' - CTG CTG GGA C - 3'	34
4	M 147	5' - GTG CGT CCT C - 3'	34
5	M 29	5' - CCG GCC TTA C - 3'	34
6	PLD 08	5' - GTG TGC CCC A - 3'	34
7	OPA 15	5' - TTC CGA ACC C - 3'	34,2
8	OPZ 05	5' - TCC CAT GCT G - 3'	34,4
9	OPP 08	5' - GTA GAC CCG T - 3'	37,6
10	OPK 20	5' - GTG TCG CGT G - 3'	38,5

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR dengan tahapan awal berupa denaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit. Proses kemudian dilanjutkan dengan denaturasi pada siklus pertama pada suhu 90 °C selama 30 detik. Tahap penempelan primer dilakukan pada suhu annealing yang disesuaikan dengan karakteristik masing-masing primer selama 30 detik. Selanjutnya, tahap pemanjangan berlangsung pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan diakhiri dengan pemanjangan akhir pada suhu yang sama selama 10 menit. Setelah seluruh tahapan PCR selesai, produk hasil amplifikasi disimpan pada suhu 4 °C untuk menjaga kestabilan DNA.