

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

EKSTRAKSI DNA RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* DENGAN METODE CETYL TRIMETYL AMMONIUM BROMIDE (CTAB)

Dwi Ayu Purwanti dan Twynnugroho Hadi Wiyanto

Loka Riset Budidaya Rumput Laut

Jl. Pelabuhan Etalase Perikanan, Desa Tabulo Selatan, Kecamatan Mananggu 96265, Boalemo, Gorontalo

E-mail: lppbri@yahoo.com

ABSTRAK

Ekstraksi DNA pada rumput laut masih mengalami banyak kendala dikarenakan rumput laut adalah jenis tumbuhan yang memiliki jaringan selulosa. Metode ekstraksi dengan *Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB) menjadi salah satu teknik untuk mempermudah dalam mendapatkan DNA makroalga khususnya untuk spesies *Kappaphycus alvarezii*. Tujuan dari kegiatan ini adalah penerapan teknik preservasi sampel dan ekstraksi DNA *K. alvarezii* dengan metode CTAB. Sampel *K. alvarezii* diambil dari 17 (tujuh belas) sentra budidaya rumput laut yang tersebar di perairan yaitu Bantaeng, Pangkep, Palopo (Sulawesi Selatan), Gorontalo, Manado (Sulawesi Utara), Lombok dan Sumbawa (NTB), Banten, Nunukan dan Bontang (Kalimantan Utara), Buton Tengah (Sulawesi Tengah), Saumlaki, Tual (Maluku Tenggara), Maumere (NTT), Halmahera Barat (Maluku Utara), Mamuju (Sulawesi Barat), dan Lampung. Tahap awal ekstraksi adalah melakukan preservasi sampel dengan mengambil bagian ujung talus muda *K. alvarezii* dan disimpan dengan *silica gel* dalam *ziplock*. Tahap selanjutnya sampel diekstraksi dengan *Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB) dengan inkubasi 55-60°C selama 60 menit. Indikator keberhasilan hasil ekstraksi adalah terdapatnya pelet DNA *K. alvarezii* yang berwarna putih dan bersih dari kontaminan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan *silica gel* dalam tahap preservasi rumput laut *K. alvarezii* mampu menjaga kualitas sampel uji, Metode CTAB dapat diterapkan untuk ekstraksi DNA tumbuhan tingkat rendah seperti pada rumput laut *K. alvarezii* dengan hasil pelet DNA yang berwarna putih, bersih, dan lebih murni.

KATA KUNCI: ekstraksi DNA; CTAB; preservasi; *Kappaphycus alvarezii*

PENDAHULUAN

Rumput laut dari jenis alga merah (*Rhodopyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis rumput laut yang tumbuh di perairan Indonesia yaitu sekitar 452 jenis. *Kappaphycus* sp. memiliki tingkat plastisitas morfologi yang sering kurang maksimal dalam penelusuran identitas spesies rumput laut (Nugroho *et al.*, 2015).

Kappaphycus alvarezii merupakan spesies yang paling banyak dibudidayakan. Peluang pasar yang tinggi menjadikan rumput laut jenis ini semakin banyak diminati. Terbatasnya pengetahuan para petani tentang *K. alvarezii* menjadikan spesies ini hanya disebutkan sebagai rumput laut kotoni di kalangan para petani rumput laut.

Identifikasi spesies dari kelas Alga merah terutama *Kappaphycus* yang banyak dilakukan saat ini menggunakan teknologi konvensional berbasis morfologi. Teknik konvensional ini sering kurang maksimal digunakan dalam identifikasi spesies, bahkan pada kasus-kasus tertentu banyak menimbulkan

kekeliruan sehubungan dengan tingkat plastisitas morfologi yang tinggi dari jenis alga ini (Zuccarelo *et al.*, 2006).

Karakter molekuler dapat dimanfaatkan untuk mengetahui variasi gen sehingga perbedaan antar jenis dapat dilihat dengan jelas. Pendekatan molekuler juga memberi peluang untuk menemukan karakter suatu jenis. Jika informasi batasan suatu jenis tersedia maka variasi plasma-nutfah dapat diakses secara lebih efisien dan efektif baik untuk pemuliaan tanaman maupun kegiatan konservasi. Pada metode lain yang berbeda, pengaplikasian teknik molekuler pada alga masih memiliki banyak kesulitan terutama dalam mendapatkan jumlah dan kualitas DNA maupun hasil amplifikasi gen target yang ideal untuk analisis molekuler selanjutnya (Anggraeni *et al.*, 2008).

Keberhasilan dalam mendapatkan DNA yang berkualitas harus diawali dengan preservasi sampel yang baik. Pengambilan sampel DNA yang benar dan sistematis tidak akan merusak kualitas DNA dan mempengaruhi hasil DNA yang didapatkan.

Pengambilan sampel dilakukan pada ujung talus rumput laut *K. alvarezii* karena titik tumbuh alga berada pada tunas yang banyak mengandung hormon pertumbuhan dan sel-sel muda yang selalu membelah (Sutrian, 2004).

Metode yang sudah lama diterapkan untuk ekstraksi DNA rumput laut adalah metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dan dikenalkan pertama oleh Doyle & Doyle (1990) untuk tanaman. Metode ekstraksi CTAB sudah banyak diterapkan untuk tumbuhan darat. Teknik ekstraksi DNA dengan metode yang benar juga akan berpengaruh pada rangkaian proses selanjutnya dalam pembacaan DNA sampel. Jaringan selulosa pada rumput laut membuat DNA rumput laut susah didapatkan.

Tujuan dari kegiatan ini adalah penerapan teknik preservasi sampel dan ekstraksi DNA rumput laut *K. alvarezii* dengan metode CTAB. Kualitas ekstraksi yang baik dapat mempermudah dalam tahapan identifikasi spesies dengan PCR dan *sequensing*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

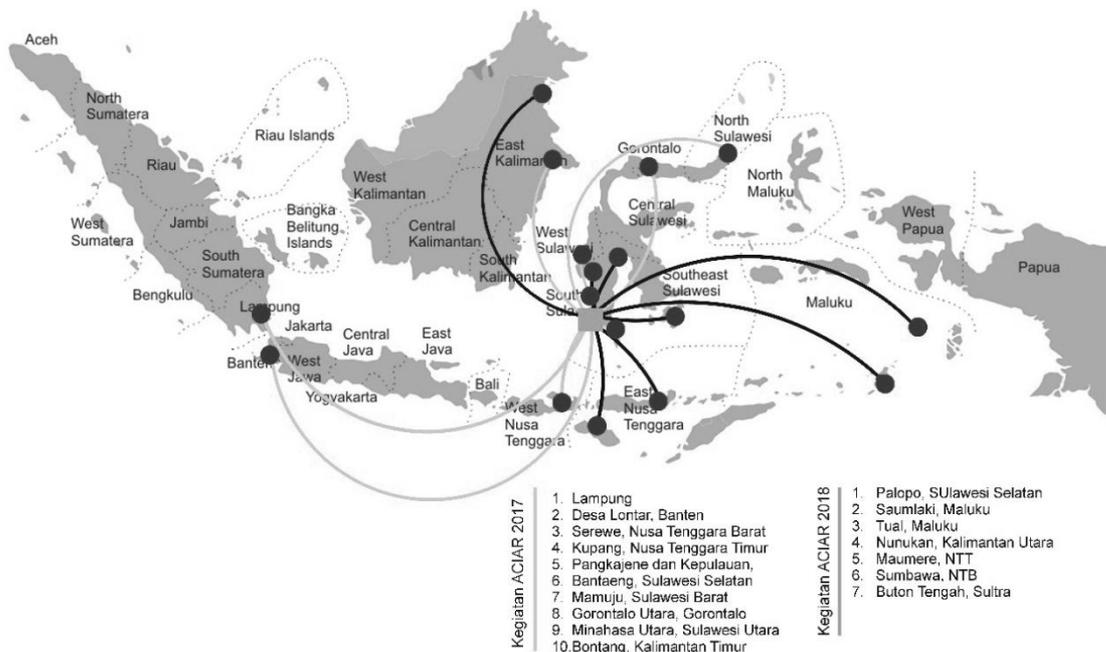
Kegiatan pengambilan sampel dilaksanakan di 17 (tujuh belas) sentra budidaya rumput laut yang tersebar di Indonesia: yaitu Bantaeng, Pangkep, Palopo, Gorontalo, Manado, Lombok, Banten, Nunukan, Buton Tengah, Sumbawa, Saumlaki, Tual, Maumere, Halmahera Barat, Mamuju, Lampung, Bontang. Kegiatan ini dilakukan pada tahun 2017 sampai dengan 2018. Ekstraksi sampel DNA dilaksanakan pada

Laboratorium Bioteknologi di Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Slipi, Jakarta dan Laboratorium Bioteknologi di Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan, Maros, Sulawesi Selatan.

Alat dan Bahan

Tabel 1. Alat dan bahan yang digunakan dalam preservasi dan ekstraksi dengan metode CTAB

Bahan untuk preservasi	Bahan untuk ekstraksi dengan metode CTAB
Silica gel	Rumput laut <i>K. alvarezii</i>
Plastik zip lock	Larutan ethanol
Tisu	Aquadest
	Es batu
	Buffer CTAB
	Cloroform : Isoamyl alcohol
	Tris HCL 0,1 M; pH 8
	NaCl 1,4 M
	PVP (Polyvinylpirrolidone) 1%
	RNAse A
	Proteinase K
	Iso Propanol
	EDTA 0,1 mM
	Microtube
	Pestle
	Eppendorf
	Centrifuge
	Rak Mikrotube
	Pinset



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel *K. alvarezii*.

Metode

Preservasi Sampel *K. alvarezii*

Pengambilan sampel dilakukan pada beberapa pembudidaya di satu lokasi, di mana setiap wilayah mewakili 10 sampel rumput laut *Kappaphycus alvarezii* secara acak. *Thallus* muda yang masih segar, muda, tidak terkena *ice-ice* diambil sekitar 3-5 cm. *Thallus* dipotong dengan perlahan dengan menggunakan pisau *cutter* agar tidak melukai jaringan rumput laut. Hasil potongan ditiriskan menggunakan tissue dan dimasukkan ke dalam plastik ziplock dan silica gel.

Ekstraksi DNA

Sampel rumput laut di dalam silica gel diambil sedikit sekitar 2-3 cm di ujungnya dengan pinset dimasukkan ke dalam mikrotube yang telah disterilisasi. Selanjutnya dimasukkan larutan CTAB 500 μ L (CTAB Ekstraksi Buffer 2%, 0,1M Tris HCL pH 8), 1,4 NaCl, 200 mM EDTA, 1% PVP, 50 μ g RNAse A, dan 80 μ g Proteinase K ditambahkan ke dalam rumput laut dan digerus hingga larutan berubah warna. Mikrotube diinkubasi selama 60 menit hingga suhu mencapai 55-60°C. Selanjutnya ditambahkan Isoamyl alkohol : Kloroform dengan perbandingan 1:24 sekitar 500 μ L dan di-*centrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, dan dilakukan kembali sebanyak dua tahap.

Supernatan dipindahkan ke dalam mikrotube yang baru kemudian ditambahkan kembali isopropanol dan dikocok perlahan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian di-*centrifuge* selama 20 (dua puluh) menit dengan kecepatan maksimal. Endapan yang terbentuk selanjutnya dicuci dengan etanol 70% dan di-*centrifuge* selama 5 menit. DNA pallet dikeringkan kurang lebih selama 20 menit hingga tidak berbau alkohol. Untuk penyimpanan dapat ditambahkan 1 mM Tris dan EDTA 0,1 mM atau aquades steril selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C.

HASIL DAN BAHASAN

Kualitas hasil ekstraksi sangat ditentukan oleh sampel DNA hasil preservasi. Penggunaan silica gel pada tahap preservasi adalah untuk menyerap kadar air pada rumput laut. Silica gel mencegah terbentuknya kelembaban yang berlebihan dan aman karena tidak meninggalkan bahan-bahan kimia pada rumput laut. Selain itu meminimalisasi kadar air pada sampel menjadi bagian yang sangat penting dalam keberhasilan ekstraksi karena dapat menimbulkan jamur atau bakteri yang dapat merusak sampel dan dapat menimbulkan kesalahan saat pembacaan DNA sesuai dengan pendapat Zuccarello & Paul (2019) keberhasilan ekstraksi adalah mengurangi degradasi

DNA dari faktor-faktor dalam DNA maupun dari luar DNA seperti epifit, bakteri, ataupun jamur.

Perbandingan yang diberikan yaitu 1:10 (satu untuk rumput laut, 10 untuk silica gel) sesuai dengan pendapat Zuccarello & Paul (2019) metode preservasi rumput laut yaitu menggunakan desikator yaitu silica gel untuk menjaga agar sampel tetap kering. Proporsi antara rumput laut dan silica gel yaitu harus lebih besar silica gel. Perbandingannya yaitu sekitar 1:10. Perubahan warna pada silica gel adalah akibat penyerapan kadar air rumput laut. Sampel rumput laut menjadi keriput, namun sampel ini akan awet hingga 5 (lima) tahun jika disimpan di tempat yang kering.



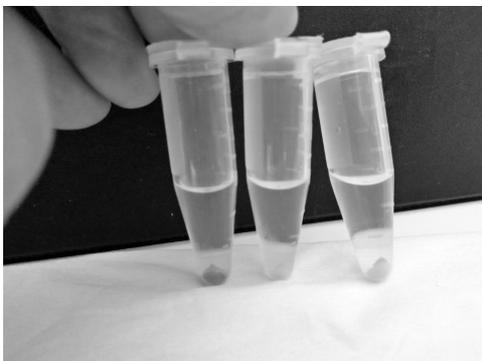
Gambar 2. Pemberian silica gel pada sampel rumput laut.

CTAB merupakan bahan kimia yang dapat menghancurkan dinding selulosa pada tumbuhan sehingga lebih mudah dalam melakukan isolasi DNA. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Dolphin, 2008). Penghancuran (lisis) yaitu penggerusan sampel dengan larutan CTAB dan bahan kimia lainnya agar DNA yang ada pada sampel dapat dipisahkan dari sel-sel yang sudah terikat oleh bahan kimia pengikat. Pemurnian yaitu dengan mensterilkan DNA yang telah terikat dan disimpan hingga akan dibaca dalam mesin PCR.

Rumput laut *K. alvarezii* yang diekstraksi dengan larutan CTAB juga ditambahkan RNAse dan Proteinase K. Fungsinya adalah untuk menghancurkan RNA yang ada pada sampel sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Hasil penggerusan sampel diinkubasi selama 60 menit hingga suhu mencapai 55-60°C. Fungsi inkubasi adalah mengoptimalkan kerja enzim yang sangat dipengaruhi oleh temperatur agar lisis dari sel sempurna. Rumput laut *K. alvarezii* memiliki kandungan karaginan sehingga suhu inkubasi tidak boleh terlalu panas karena dapat mengakibatkan

pembentukan gel. Gel yang terbentuk pada larutan akan menyulitkan DNA untuk dapat tereskraksi.

Setelah inkubasi ditambahkan Isoamyl alcohol: Kloroform (1:24), yang berfungsi untuk mengikat strand-strand DNA yang terkumpul. Strand-strand yang terikat akan membentuk benang-benang putih yang terapung di atas filtrat. Selanjutnya larutan disentrifuge yang bertujuan untuk memisahkan molekul dan denaturasi protein (DNA) yang sesuai dengan pendapat Miller (2000) bahwa sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan sel menjadi organel-organel utama sehingga fungsinya dapat diketahui. Hasil pencampuran ini akan membentuk 2 layer, yaitu cairan di bagian atas dan endapan di bagian bawah. Cairan bagian atas yang berisi DNA dipindahkan ke tube baru untuk dicuci kembali dengan Isoamyl alkohol: kloroform.



Gambar 3. Layer akibat pemberian isoamyl alkohol: kloroform.

Pada tahap selanjutnya hasil *sentifuge* pada bagian supernatan dipindahkan ke tube baru untuk ditambahkan isopropanol. Fungsi isopropanol adalah untuk menghilangkan molekul air dalam larutan DNA sehingga DNA akan terpresipitasi. Penggunaan isopropanol dingin juga akan menurunkan aktivitas molekul air sehingga memudahkan presipitasi DNA. Menurut Surzycki (2000), prinsip-prinsip presipitasi antara lain menurunkan kelarutan asam nukleat dalam air. Tube dikocok perlahan dan diletakkan pada suhu ruang selama 30 menit. Indikator keberhasilan ekstraksi adalah terdapat pellet DNA di bagian bawah tube setelah *sentifuge*.

DNA pallet ditambahkan ethanol 70% untuk membersihkan isopropanol dan sisa-sisa bahan kimia lainnya dan garam yang mungkin masih menempel pada DNA pallet.

Hasil pengujian 17 sampel rumput laut *K. alvarezii* menunjukkan bahwa terdapat endapan/pellet DNA disemua tube setelah pemberian isopropanol. Secara umum warna pellet yang terbentuk adalah putih. Apabila terdapat warna lain yang di luar endapan kemungkinan terjadinya kontaminasi. Beberapa faktor



Gambar 4. DNA pallet sebagai output ekstraksi.



Gambar 5. Penambahan ethanol 70%.

terjadinya kontaminasi seperti sampel yang kurang baik, proses penggerusan yang tidak maksimal, dan saat pencucian dengan Isoamyl alcohol: Kloroform terambil endapan di bagian bawah.

Ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB ini membutuhkan waktu sekitar 2 jam hingga 3 jam dalam pengerjaannya. Keberhasilan sangat ditentukan oleh kondisi sampel dan proses penggerusan. Hambatan yang ditemui adalah sampel yang sudah mengeras cukup sulit dilarutkan, sehingga DNA tidak dapat terekstraksi dengan maksimal. Indikator jaringan sudah larut adalah adanya perubahan warna pada larutan CTAB. Metode CTAB dapat menghasilkan ekstrak DNA yang lebih bersih, lebih murni, dan dengan konsentrasi yang lebih tinggi, diharapkan mampu mendukung kesuksesan proses amplifikasi DNA dan *sequencing* DNA.

KESIMPULAN

Penggunaan silica gel dalam tahap preservasi rumput laut *K. Alvarezii* mampu menjaga kualitas sampel uji, Metode CTAB dapat diterapkan untuk ekstraksi DNA tumbuhan tingkat rendah seperti pada rumput laut *K. alvarezii* dengan hasil pellet DNA yang berwarna putih, bersih dan lebih murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni, S.R., Sudarsono, & Soedharma, D. (2008). Karakterisasi Genetika Rumput Laut *Eucheuma* spp. dari Tiga Daerah di Indonesia. *Jurnal Bionatura*, 10(3), 196-208.
- Dolphin, W.D. (2008). *Biological Investigations*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Doyle & Doyle. (1987). CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol.
- Giuseppe, C., Zuccarello, & Nicholas A. Paul. (2019). A Beginner's Guide to Molecular Identification of Seaweed. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. *Squalen Bull. of Mar. and Fish. Postharvest and Biotech*, 14(1), 43-53.
- Miller, J.N. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed. Harlow, Prentice Hall.
- Nugroho, K., Terryana, R.T., & Lestari, P. (2015). Optimasi Metode Isolasi DNA pada *Jatropha* spp. *Jurnal Agroteknologi*, 5(2), 15-22.
- Surycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York.
- Sutrian & Yayan. (2004). *Pengantar Anatomi Tumbuh-Tumbuhan Tentang Sel dan Jaringan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Zuccarello, G.C., Cricthley, A.T., Smith, J., Sieber, V., Lhonneur, G.B., & West, J.A. (2006). Systematic and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 18(3-5), 643-651.