

## **Komparasi Metode Isolasi DNA Patogen Antraknosa dan Bulai untuk Deteksi PCR**

### **Comparison of DNA Isolation Methods of Anthracnose and Downy Mildew Pathogens for PCR Detection**

**Ade Syahputra, Kikin Hamzah Mutaqin\*, Tri Asmira Damayanti**  
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### **ABSTRAK**

Teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sangat penting untuk kegiatan deteksi, identifikasi dan pemantauan organisme pengganggu tumbuhan karantina di wilayah Indonesia. Teknik ini perlu didukung dengan metode isolasi DNA yang memadai untuk menyiapkan DNA templat. Tujuan penelitian ialah mengevaluasi beberapa metode isolasi DNA, yaitu secara konvensional, FTA-card dan modifikasinya, serta kit komersial untuk digunakan dalam teknik deteksi PCR yang optimum terhadap *Colletotrichum acutatum* dan *Peronosclerospora sorghi* berturut-turut sebagai patogen pada buah cabai dan tanaman jagung. DNA hasil isolasi masing-masing metode tersebut diukur dengan UV-vis nanodrop-spektrofotometer dan selanjutnya untuk PCR digunakan konsentrasi DNA templat, yaitu 15 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  dan konsentrasi primer, yaitu 0.4; 0.6; 0.8; dan 1.0  $\mu\text{M}$  untuk setiap metode isolasi. Hasil penghitungan menunjukkan bahwa konsentrasi DNA tertinggi hasil isolasi diperoleh melalui metode konvensional pada *C. acutatum* asal buah cabai dan *P. sorghi* asal daun jagung. Kemurnian DNA yang baik dari hasil isolasi diperoleh pada *C. acutatum* asal buah dengan kit komersial (nilai 1.94) dan *C. acutatum* asal biakan murni secara konvensional (nilai 1.91). Jumlah DNA total tertinggi secara nyata untuk kedua patogen diperoleh melalui metode FTA-card yang dimodifikasi untuk *C. acutatum* asal biakan murni. PCR menggunakan keempat konsentrasi primer menunjukkan seluruh target berhasil diamplifikasi walaupun terdapat perbedaan ketebalan pita DNA. Lebih lanjut PCR menggunakan konsentrasi primer yang optimal pada ketiga metode isolasi menunjukkan bahwa semua contoh DNA menghasilkan pita DNA ampikon yang tebal dan merata.

Kata kunci: *Colletotrichum acutatum*, karantina, *Peronosclerospora sorghi*

#### **ABSTRACT**

Polymerase chain reaction (PCR) is an important tool for detection, identification and monitoring of quarantine pests in Indonesia. DNA isolation method from target organism is an important step to provide adequate DNA template for performing PCR. Objective of the research was to compare conventional, commercial kit, FTA-card and its modification methods of DNA isolation to be used in PCR detection for *Colletotrichum acutatum* and *Peronosclerospora sorghi* from chili and maize, respectively. DNA obtained from various isolation methods were measured using UV-vis nanodrop-spectrophotometry. DNA amplification was performed using DNA concentration of 15 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  from each isolation method with gradual primer concentrations of 0.4; 0.6; 0.8; and 1.0 mM. The highest concentration of DNA was achieved with conventional methods for *C. acutatum* from pure culture and *P. sorghi* from maize leaf. Best DNA purity was obtained from isolation method using commercial kit

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680  
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-862962, Surel: kikinhm@yahoo.com

for *C. acutatum* from infected fruit (1.94) and from conventional method for *C. acutatum* from pure culture (1.91). The highest total yield of isolated DNA was achieved by modified FTA-card for *C. acutatum* from pure culture. In general DNA amplification using various primer concentration gave positive results although DNA bands intensity was varied from faint to very bright. Furthermore PCR optimization using the best primer concentration from previous reaction showed that all DNA templates resulted in thick and bright DNA bands.

Key words: *Colletotrichum acutatum*, *Peronosclerospora sorghi*, quarantine

## PENDAHULUAN

Metode isolasi DNA untuk mendapatkan templat DNA yang akan digunakan dalam *polymerase chain reaction* (PCR) telah mengalami perkembangan mulai dari cara konvensional menggunakan larutan penyangga yang disiapkan sendiri hingga cara terkini menggunakan kit komersial. Penggunaan kit komersial berbasis formulasi larutan penyangga saat ini banyak dilakukan karena lebih efisien dan praktis. Teknik PCR mensyaratkan komponen templat DNA yang digunakan memiliki kemurnian dan konsentrasi tinggi sehingga amplifikasi dapat berlangsung optimum. Tingkat kemurnian, konsentrasi, dan kualitas DNA sangat ditentukan oleh metode isolasi DNA. Perbedaan kandungan DNA kontaminan dan adanya DNA bukan target menyebabkan perbedaan metode isolasi DNA organisme. Pemilihan metode isolasi DNA yang tepat dan memadai berperan penting untuk keberhasilan teknik PCR (Tan dan Yiap 2009).

Deteksi dan identifikasi patogen tumbuhan menggunakan teknik PCR, sudah banyak dilakukan petugas karantina tumbuhan. Hal ini terkait dengan tindakan pencegahan dan pemantauan terhadap pemasukan dan penyebaran organisme pengganggu tumbuhan karantina (OPTK) di wilayah Indonesia (BKP 2007).

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi tiga metode isolasi DNA untuk mendeteksi *Colletotrichum acutatum* penyebab penyakit antraknosa pada cabai dan *Peronosclerospora sorghi* penyebab penyakit bulai pada jagung dengan metode PCR.

## BAHAN DAN METODE

### Penyiapan Bahan Tanaman dan Isolat Patogen

Penelitian ini menggunakan buah cabai bergejala antraknosa yang disebabkan oleh *C. acutatum* dan daun jagung bergejala bulai yang disebabkan oleh *P. sorghi*. Isolat *C. acutatum* diisolasi dari buah cabai bergejala antraknosa dan dibuat biakan murni. Selanjutnya miselium *C. acutatum* diperbanyak pada medium *potato dextrose broth* (PDB) digunakan sebagai material isolasi DNA. Isolasi DNA cendawan *P. sorghi* menggunakan daun bergejala karena patogen bulai tidak bisa ditumbuhkan pada medium buatan. Sampel tanaman uji diperoleh dari kebun petani di Kelurahan Situgede, Kota Bogor.

### Isolasi DNA Total *C. acutatum* dan *P. sorghi*

Isolasi DNA total secara konvensional dari jaringan buah cabai dan daun jagung sakit dilakukan dengan metode Warburton dan Hoisington (2001). Sebanyak 0.1 g jaringan dipotong-potong kecil dan dikeringbekukan dengan nitrogen cair, lalu digerus menjadi tepung menggunakan mortar. Hasil gerusan diresuspensi dengan 400  $\mu$ L bufer ekstraksi (1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 2% CTAB, dan 1.25%  $\beta$ -merkaptotanol) dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 60 menit dalam penangas air. Suspensi dihomogenasi dengan dibolak-balik setiap 10 menit. Sebanyak 500  $\mu$ L kloroform:isoamilalkohol (CI) [24:1, v/v] ditambahkan ke dalam suspensi dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan

ditambahkan 1× volume isopropanol. Pelet DNA diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan etanol 70% dengan sentrifugasi kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA dikeringanginkan, kemudian dilarutkan dalam 75 µL bufer TE 1× (10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA).

Isolasi DNA miselium *C. acutatum* yang berumur 4 hari dilakukan menurut Abd-Elsalam *et al.* (2003) dengan modifikasi minor. Miselium dari biakan dalam medium cair dekstrosa kentang dipanen dengan penapisan menggunakan kertas saring. Sebanyak 0.1 g dikeringbekukan dengan nitrogen cair, lalu digerus menjadi tepung dengan mortar. Hasil gerusan dipindahkan ke tabung mikro 1.5 mL dan dicuci dengan 500 µL bufer TE 1×. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet ditambah 300 µL bufer ekstraksi (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, dan *sodium dodecyl sulphate* 0.5%) dan dikocok selama 5 menit. Sebanyak 150 µL natrium asetat (pH 5.2) ditambahkan ke suspensi dan diinkubasi pada suhu 20 °C selama 10 menit. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dimasukkan ke tabung baru dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA diambil dan dicuci dengan 500 µL etanol 70% melalui sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 5 menit, lalu dikeringanginkan pada suhu ruang. Selanjutnya pelet DNA dilarutkan dalam 75 µL bufer TE 1× kemudian simpan pada suhu -20 °C.

Isolasi DNA total dari jaringan tanaman yang terinfeksi *C. acutatum* dan *P. sorghi* dilakukan dengan FTA-card standar sesuai protokol (Whatman 2000). Isolasi DNA *C. acutatum* dari buah cabai dan *P. sorghi* dari daun jagung juga dilakukan dengan metode FTA-card yang dimodifikasi, yaitu dengan penambahan 10 µL bufer TE 0.1 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) ke dalam tabung PCR. Tabung PCR diletakkan dalam kondisi

terbuka di dalam *microwave* dengan daya 1100 W selama 1 menit, selanjutnya bufer dan *punch* diaduk dengan menaikturunkan bufer menggunakan mikropipet sebanyak 2 kali. Pemanasan dengan *microwave* diulang sekali lagi. *Punch* dikeringanginkan pada suhu ruang selama 1 jam (dengan membuka penutup tabung PCR) atau dikeringkan di dalam oven bersuhu 56 °C selama 20 menit.

Biakan murni *C. acutatum* berumur 4 hari pada medium agar-agar dekstrosa kentang dengan diameter 3 cm diambil menggunakan tusuk gigi, lalu dimasukkan ke dalam tabung PCR yang berisi 25 µL bufer TE 1×. Tabung PCR dengan posisi terbuka diletakkan didalam *microwave* dengan daya 1100 W selama 1 menit, selanjutnya contoh dan bufer diaduk dengan menaikturunkan bufer menggunakan mikropipet sebanyak 2 kali. Pemanasan dengan *microwave* diulang satu kali (Suzuki *et al.* 2006). Sebanyak 5 µL suspensi cendawan tersebut diambil, lalu diteteskan pada FTA-card dan dikeringkan pada suhu ruang selama 10 menit. FTA-card dipotong menggunakan *Harris Micro Punch* (diameter 2 mm). Isolasi DNA untuk kedua patogen menggunakan kit komersial (Philekorea Technology/PKT) dilakukan sesuai dengan protokol.

### **Pengukuran Konsentrasi DNA Hasil Isolasi**

Konsentrasi DNA total pada metode kit dan konvensional langsung diukur dari hasil isolasi. DNA yang melekat pada potongan (*punch*) FTA-card diameter 2 mm diresuspensi dengan 10 µL bufer elusi yang sudah dipanaskan dengan suhu 65 °C selama 10 menit dalam tabung PCR. Setiap tabung PCR disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 3 menit agar DNA keluar dari *punch* FTA-card tersuspensi ke dalam bufer tersebut. DNA templat hasil isolasi berbagai metode tersebut diukur dengan meneteskan sebanyak 1 µL suspensi ke atas UV-Vis<sup>®</sup> nanodrop-spektrofotometer yang diulang 3 kali.

Jumlah DNA total yang berhasil diisolasi menggunakan metode FTA-card standar dan modifikasi dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

Jumlah DNA total =  $\frac{a \times b \times c}{d}$ , dengan

a, konsentrasi DNA (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ); b, volume suspensi (10  $\mu\text{L}$ ); c, luas kertas FTA yang berisi contoh; d, luas satu *punch* (3.14 mm<sup>2</sup>).

Jumlah DNA total yang diisolasi menggunakan metode konvensional dan kit dihitung berdasarkan hasil kali konsentrasi asam nukleat dengan volume larutan hasil resuspensi asam nukleat dari isolasi DNA (75  $\mu\text{L}$ ). Data pengamatan yang diperoleh ialah konsentrasi (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), kemurnian (nisbah nilai absorbansi pada A260/280 untuk DNA protein), dan jumlah total DNA (mg).

Data konsentrasi dan jumlah total DNA hasil isolasi disusun dalam rancangan acak lengkap dengan faktor perlakuan metode isolasi dengan masing-masing metode isolasi diulang sebanyak 3 kali. Analisis ragam dan uji perbandingan nilai tengah Tukey pada  $\alpha$  5% menggunakan peranti lunak Minitab 16.

### Amplifikasi PCR

Reaksi amplifikasi PCR untuk deteksi *C. acutatum* dan *P. sorghi* dilakukan menggunakan alat *thermal cycler* AB (Applied Biosystem™) Veriti dengan total volume reaksi 25  $\mu\text{L}$ . Pasangan primer yang digunakan dalam PCR ini adalah primer spesifik untuk masing-masing patogen yang dideteksi (Tabel 1). PCR dilakukan sebanyak 2 kali. PCR pertama (A), komponen reaksi PCR

terdiri atas: *Dream Taq Green PCR master mix* (Thermo Scientific™) 2× sebanyak 12.5  $\mu\text{L}$ , primer *forward* dan *reverse* pada konsentrasi variabel untuk tujuan optimasi 0.4, 0.6, 0.8, dan 1 mM, masing-masing 1  $\mu\text{L}$ , templat DNA sebanyak 15 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , dan air bebas nuklease sebanyak 8.5–9.5  $\mu\text{L}$ . Sebagai kontrol internal, pasangan primer *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase gene* (*Rubisco* L) dengan konsentrasi 0.2  $\mu\text{M}$  masing-masing sebanyak 0.5  $\mu\text{L}$  sebagai duplex PCR untuk *C. acutatum* pada buah, sedangkan PCR kedua (B) sebagai kontrol negatif untuk kedua patogen. PCR kedua (B) dilakukan persis seperti tahap pertama, namun konsentrasi primer yang digunakan ialah satu konsentrasi terbaik dari hasil PCR tahap pertama pada masing-masing metode isolasi.

Semua amplicon hasil PCR dielektroforesis menggunakan agarosa 1.5 %, dalam larutan penyangga TAE 1×, pada daya 50 V, 70 mA, selama 50 menit dengan volume PCR produk 7.5  $\mu\text{L}$  untuk tiap kolom. Gel agarosa diwarnai dengan larutan EtBr 10% selama 30 menit, divisualisasi dengan UV transilluminator dan didokumentasikan.

## HASIL

### Isolasi DNA *C. acutatum*

Keberhasilan isolasi DNA dapat ditunjukkan oleh konsentrasi dan kemurnian

Tabel 1 Pasangan primer yang digunakan dalam PCR untuk deteksi *Colletotrichum acutatum* dan *Peronosclerospora sorghi*

Primer	Urutan nukleotida (5'→3') dan siklus PCR	Amplicon	Sumber
<i>C. acutatum</i>			
CaInt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG		
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	±500 pb	Brown <i>et al.</i> 1996
	[95 °C 5 mnt; 40X (95°C30 detik, 60 °C 30 detik, 72 °C 1 mnt); 72 °C 7 mnt, 4 °C~]		
<i>P. sorghi</i>			
PsUF	CCAGCAACTCCAGTTATGGAA		
PsUR	CATGTACAATGGTRC TTGGAA	±154 pb	Rustiani <i>et al.</i> 2015
	[94 °C 2 mnt; 30X (94 °C 30 detik, 56 °C 1 mnt, 72 °C 1 mnt); 72 °C 5 mnt, 4 °C~]		
Kontrol internal			
RBCL-F535	CTTTCCAAGGCCCGCCTCA		
RBCL-R705	CATCATCTTTGGTAAAATCAAGTCCA	±171 pb	Nassuth <i>et al.</i> 2000

DNA yang diperoleh dari masing-masing metode isolasi. Konsentrasi DNA total hasil *C. acutatum* dari buah tidak menunjukkan berbeda nyata antara ketiga metode uji (berkisar antara 7.1 dan 238.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Tingkat kemurnian DNA total hasil isolasi ketiga metode berkisar antara 1.52 dan 1.94. Tingkat kemurnian DNA dinyatakan memadai jika bernilai 1.8–2.0. Metode kit komersial merupakan metode yang memenuhi persyaratan tersebut, yaitu bernilai 1.94. Jumlah DNA total berkisar antara 0.53 dan 19.17 mg tidak menunjukkan perbedaan yang nyata di antara ketiga metode tersebut (Tabel 2).

Konsentrasi DNA hasil isolasi *C. acutatum* dari biakan murni menunjukkan perbedaan yang nyata, yaitu metode konvensional menghasilkan konsentrasi tertinggi sebesar 45.8 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  dari kedua metode isolasi lainnya yang berkisar antara 6.4 dan 20.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Kemurnian DNA total yang tergolong baik, yaitu 1.91 diperoleh dari metode konvensional. Jumlah DNA total menunjukkan perbedaan yang nyata, yaitu metode FTA-card modifikasi mencapai yang tertinggi (Tabel 2).

#### Isolasi DNA *P. sorghi*

Konsentrasi DNA total isolasi *P. sorghi* dari daun jagung juga menunjukkan perbedaan yang nyata dengan konsentrasi tertinggi sebesar 213.74 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  diperoleh dari metode konvensional dibandingkan dengan kedua metode lainnya (6.1–23.9 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Kemurnian DNA total hasil isolasi *P. sorghi* pada ketiga metode berkisar 1.56–2.18, namun tidak ada yang tergolong baik yang masuk kisaran 1.8–2.0. Jumlah DNA total hasil isolasi *P. sorghi* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada ketiga metode tersebut (0.43–38.82 mg) (Tabel 2).

#### Amplifikasi DNA *C. acutatum* Asal Buah

PCR pertama *C. acutatum* dari buah menunjukkan hasil positif pada hampir semua metode isolasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA amplikon berukuran  $\pm 500$  pb. Namun kualitas pita DNA yang dihasilkan beragam untuk setiap metode dan konsentrasi primer. Pita DNA teramplifikasi cukup tebal diperoleh dari templat yang diisolasi dengan metode kit, sedangkan pita DNA lebih tipis diperoleh dari DNA templat yang diisolasi dengan metode FTA modifikasi.

Tabel 2 Konsentrasi, kemurnian pada nilai absorbansi A260/280 dan jumlah total DNA hasil isolasi pada tiga metode untuk *Colletotrichum acutatum* dari buah cabai sakit dan biakan murni serta *Peronosclerospora sorghi* dari daun jagung sakit

Metode isolasi	Konsentrasi (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Kemurnian <sup>a</sup>	$\Sigma$ DNA total (mg)
<i>C. acutatum</i> dari buah cabai sakit			
Kit	7.1 $\pm$ 3.3 a	1.94	0.53 $\pm$ 0.24 a
FTA standar	9.7 $\pm$ 3.6 a	1.54	10.93 $\pm$ 4.40 a
FTA modifikasi	17.3 $\pm$ 4.2 a	1.52	19.17 $\pm$ 3.79 a
Konvensional	238.4 $\pm$ 197.4 a	1.57	17.88 $\pm$ 14.81 a
<i>C. acutatum</i> biakan murni			
Kit komersial	20.2 $\pm$ 6.5 a	2.33	1.52 $\pm$ 0.48 a
FTA standar	6.4 $\pm$ 2.9 a	1.55	7.50 $\pm$ 2.70 ab
FTA modifikasi	10.7 $\pm$ 4.1 a	1.51	12.85 $\pm$ 5.24 b
Konvensional	45.8 $\pm$ 8.4 b	1.91	3.43 $\pm$ 0.63 a
<i>P. sorghi</i> dari daun jagung sakit			
Kit komersial	6.1 $\pm$ 2.4 a	2.18	0.43 $\pm$ 0.21 a
FTA standar	10.0 $\pm$ 2.2 a	1.60	14.80 $\pm$ 6.31 a
FTA modifikasi	23.9 $\pm$ 10.0 a	1.56	38.82 $\pm$ 30.75 a
Konvensional	213.7 $\pm$ 53.1 b	1.74	16.03 $\pm$ 3.99 a

<sup>a</sup>Tingkat kemurnian DNA dinyatakan memadai jika berada pada kisaran nilai 1.8–2.0 (Sambrook *et al.* 1989).

Angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada Uji Tukey  $\alpha$  5%

Kontrol internal *Rubisco L* teramplifikasi PCR dengan produk  $\pm$  171 pb. PCR kedua menggunakan konsentrasi primer optimum untuk masing-masing metode, yaitu kit komersial 1.0  $\mu$ M, FTA standar 0.8  $\mu$ M, FTA modifikasi 0.8  $\mu$ M, dan konvensional 0.8  $\mu$ M. Semua hasil PCR menunjukkan pita DNA positif dengan ketebalan yang baik dan merata (Gambar 1).

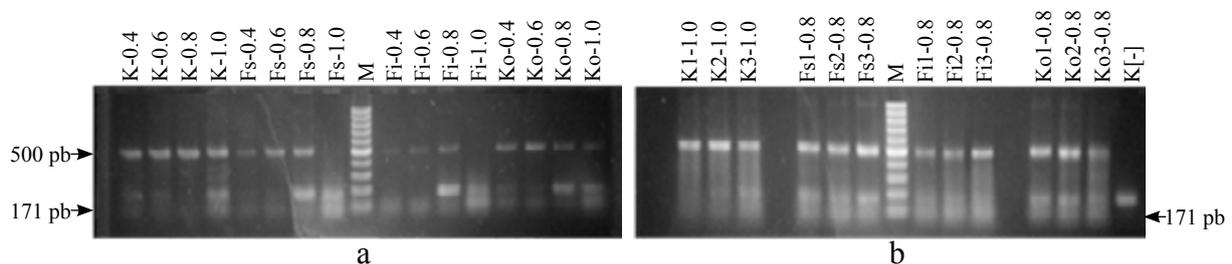
### Amplifikasi DNA *C. acutatum* Asal Biakan Murni

PCR pertama untuk *C. acutatum* asal biakan murni menunjukkan hasil positif berupa pita DNA ampikon berukuran  $\pm$  500 pb pada semua contoh DNA hasil isolasi keempat metode, namun kualitas pita DNA yang dihasilkan beragam pada setiap metode dan antar konsentrasi primer. Kontrol internal *Rubisco L* tidak teramplifikasi. PCR kedua untuk *C. acutatum* dari biakan murni diperbaiki dengan konsentrasi primer

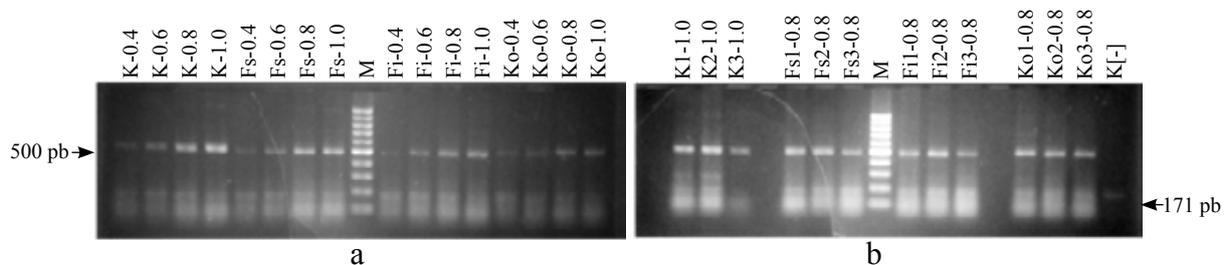
optimum terpilih, yaitu untuk metode kit komersial 1.0  $\mu$ M, FTA standar 0.8  $\mu$ M, FTA modifikasi 0.8  $\mu$ M dan konvensional 0.8  $\mu$ M, sehingga diperoleh hasil positif pada semua contoh dengan ketebalan pita DNA yang baik (Gambar 2).

### Amplifikasi DNA *P. sorghi* Asal Daun

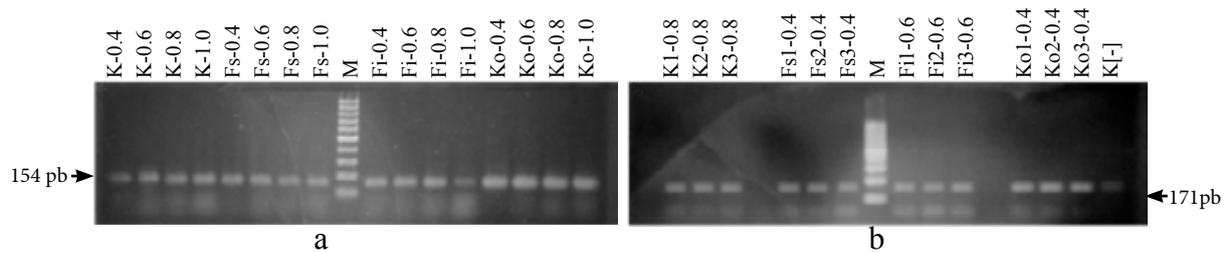
PCR pertama untuk *P. sorghi* dari daun jagung menunjukkan hasil positif untuk semua contoh DNA dari ketiga metode isolasi dengan kualitas pita DNA ampikon berukuran  $\pm$  154 pb yang baik dan merata ketebalannya. Walaupun PCR pertama sudah diperoleh hasil yang optimum dan memuaskan, PCR kedua pada patogen tersebut tetap dilakukan dengan menggunakan konsentrasi primer terpilih, yaitu untuk metode kit 0.8  $\mu$ M, FTA standar 0.4  $\mu$ M, FTA modifikasi 0.6  $\mu$ M dan konvensional 0.4  $\mu$ M yang juga diperoleh hasil positif untuk semua contoh dengan kualitas pita DNA yang baik dan merata (Gambar 3).



Gambar 1 Amplifikasi DNA *Colletotrichum acutatum* hasil isolasi dari buah cabai menggunakan CaInt2/ITS4 dengan target produk  $\pm$  500 pb. a, PCR pertama dengan konsentrasi primer variabel 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0  $\mu$ M ; b, PCR kedua dengan konsentrasi primer optimum 0.8 atau 1.0  $\mu$ M dengan masing-masing ulangan 1, 2 dan 3; K, metode kit komersial; Fs, FTA-card standar; Fi, modifikasi; Ko, konvensional; M, penanda 100 pb dan; (K[-]) kontrol negatif.



Gambar 2 Amplifikasi DNA *Colletotrichum acutatum* hasil isolasi dari biakan murni menggunakan CaInt2/ITS4 dengan target produk  $\pm$  500 pb. a, PCR pertama dengan konsentrasi primer variabel 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0  $\mu$ M; b, PCR kedua dengan konsentrasi primer optimum 0.8 atau 1.0  $\mu$ M dengan masing-masing ulangan 1, 2 dan 3; K, metode kit komersial; Fs, FTA-card standar; Fi, modifikasi, Ko, konvensional; M, penanda 100 pb dan; (K[-]) kontrol negatif.



Gambar 3 Amplifikasi DNA *Peronosclerospora sorghi* hasil isolasi dari daun jagung menggunakan PsUF/PsUR dengan target produk  $\pm 154$  pb. a, PCR pertama dengan konsentrasi primer variabel 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0  $\mu\text{M}$ ; b, PCR kedua dengan konsentrasi primer optimum 0.8 atau 1.0  $\mu\text{M}$  dengan masing-masing ulangan 1, 2 dan 3; K, metode kit komersial; Fs, FTA-card standar ; Fi, modifikasi; Ko, konvensional; M, penanda 100 pb dan ; (K[-]) kontrol negatif.

## PEMBAHASAN

Metode isolasi DNA secara konvensional memiliki tahap yang panjang sehingga memerlukan alat dan bahan kimia atau bufer yang lebih banyak. Berbeda halnya dengan kit komersial atau FTA-card dan modifikasinya yang dikembangkan dengan tujuan lebih praktis, yakni melalui penggunaan kolom spin yang mengandung membran silika (Siddappa *et al.* 2007) dan kertas membran dengan hasil yang memadai. Kelebihan lain metode kit komersial ialah pemisahan metode berdasarkan target DNA atau RNA (Tan dan Yiap 2009).

Isolasi DNA dengan FTA-card memiliki keuntungan pada waktu isolasi yang lebih singkat. Burgoyne (1996) sebagai penemu metode FTA-card mengatakan bahwa selain untuk isolasi di lapangan selanjutnya kertas yang berisi DNA/RNA tersebut dapat disimpan 1.5–11 tahun pada suhu ruang dan DNA/RNA masih dapat terdeteksi dengan baik (Whatman 2002). Keempat metode isolasi memiliki kemampuan mengisolasi DNA yang berbeda-beda. Konsentrasi DNA metode konvensional menunjukkan nilai tertinggi dibandingkan dengan FTA-card dan kit komersial. Menurut Tan dan Yiap (2009) metode konvensional adalah metode orisinal yang dikembangkan melalui tahap-tahap optimum dan lengkap dalam pemisahan asam nukleat, namun belum mempertimbangkan aspek kepraktisan. Rendahnya konsentrasi DNA pada metode kit komersial disebabkan adanya enzim RNase yang ditambahkan untuk mengeliminasi

RNA. Begitu juga dengan metode FTA-card bahwa rendahnya konsentrasi asam nukleat kemungkinan terkontaminasi dengan bahan kimia yang terdapat dalam membran kertas FTA. Burgoyne (1996) melaporkan bahwa kertas FTA mengandung agens *chaotropic* seperti *guanidine isothiocyanate* yang berfungsi melisis dinding sel atau lemak.

Nisbah kemurnian DNA yang diukur ialah nisbah nilai absorbansi DNA A260 dengan nilai absorbansi protein (kontaminan) A280. Menurut Sambrook *et al.* (1989) hasil isolasi DNA yang murni dengan nilai 1.8–2.0. Kemurnian DNA diatas nilai 2 dilaporkan mungkin terkontaminasi RNA dan dibawah nilai 1.8 karena terkontaminasi protein dan larutan fenol (Neil *et al.* 2011). Kemurnian DNA pada FTA standar selalu di bawah nilai 1.8, sedangkan metode kit cenderung lebih tinggi dari 2.0. Capote *et al.* (2012) melaporkan bahwa isolasi dengan metode kit menggunakan bahan-bahan tertentu dan kolom dapat menghasilkan asam nukleat dengan tingkat kemurnian yang tinggi. Tingkat nisbah kemurnian DNA yang relatif baik diperoleh pada metode konvensional yang menunjukkan kecenderungan mendekati nilai kemurnian ideal 1.8–2.0. Fitzgerald dan Burden (2014) melaporkan kisaran kemurnian DNA tanaman dari metode konvensional antara 1.72–1.90.

Bobot DNA total dari hasil isolasi keempat metode dan kedua patogen tidak menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Kisaran bobot total DNA hasil isolasi yang diperoleh dari ketiga metode untuk kedua jenis patogen masih memadai untuk selanjutnya digunakan sebagai

templat DNA dalam PCR, yaitu berkisar antara 10 µg dan 1 mg (Thermo Scientific).

Keberhasilan PCR untuk deteksi patogen tumbuhan salah satunya ditentukan oleh kualitas dan kuantitas templat DNA hasil isolasi dan komponen-komponen PCR lainnya termasuk konsentrasi primer. Menurut Sambrook *et al.* (1989) keberhasilan pengujian PCR tidak harus memiliki kemurnian DNA yang tinggi, tetapi dapat dipengaruhi oleh EDTA dan kloroform. Sharma *et al.* (2013) melaporkan bahwa perbedaan metode isolasi DNA pada patogen tanaman memberikan hasil yang berbeda terhadap konsentrasi dan kemurnian DNA.

Konsentrasi primer optimum untuk uji PCR terhadap DNA dari tiap metode isolasi berbeda-beda. Hal ini disebabkan kualitas pita DNA untuk menentukan primer optimum dipengaruhi oleh konsentrasi primer itu sendiri selain konsentrasi templat DNA. Menurut Hoelzel dan Green (1992) kespesifikan dan kualitas PCR bergantung pada konsentrasi primer optimal, yaitu 0.1–2.0 µM.

*Duplex* PCR menggunakan primer kontrol internal bertujuan memastikan proses pengujian PCR sudah benar, tidak terjadi kesalahan teknis preparasi/pengerjaan premix PCR. Kontrol internal menggunakan primer *Rubisco* L dapat mengamplifikasi dengan multiplex PCR *Cassava mosaic Begomovirus* pada singkong (Rajabu *et al.* 2013).

Konsentrasi DNA paling tinggi diperoleh dari metode konvensional dan kemurnian DNA paling baik diperoleh dari metode kit dan konvensional. Templat DNA kedua patogen yang diperoleh dari metode FTA-card baik standar maupun modifikasi mampu teramplifikasi dengan PCR atau sebanding dengan templat DNA yang diisolasi dari metode kit dan konvensional. Metode isolasi ini dapat dimanfaatkan untuk koleksi dan penyimpanan sampel DNA patogen dari lapangan. Optimasi PCR terhadap konsentrasi primer dapat memberikan hasil terbaik serta penambahan volume ampikon pada saat elektroforesis untuk meningkatkan kualitas pita. Terdapat perbedaan pita DNA hasil PCR dari tiap konsentrasi primer (Loffert *et*

*al.* 1999). Pita paling tebal diperoleh dengan konsentrasi primer paling tinggi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Karantina Pertanian, Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian dan Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian atas dukungan dana dan fasilitas penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam KA, Ibrahim N A, Abdel-Satar MA, Khalil MS, Verreet JA. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr J Biotech.* 2(4):82–85. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2003.000-1016>.
- [BKP] Badan Karantina Pertanian. 2007. Pedoman Surveilensi Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina. Jakarta (ID): BKP.
- Brown AE, Sreenivasaprasad S, Timmer LW. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Mol Plant Pathol.* 8(5):523–527.
- Burgoyne LA, penemu; Flinders Technologies Pty. Ltd. 1999 Nov 16. Solid medium and method for DNA storage. Paten Amerika Serikat US 5985327.
- Capote N, Pastrana AM, Aguado A, Torres PS. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. Di dalam: Cumagun CJ, editor. *Plant Pathology*. Slavka Krautzeka (HR): In Tech Europe. hlm 151–202.
- Fitzgerald FK, Burden DW. 2014. Evaluation of the synergy rapid plant DNA isolation Chemistry. *Random Primers.* 13:1–7.
- Hoelzel AR, Green A. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. Di dalam: Hoelzel AR, editor. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford (UK): IRL Pr. Hhlm 159–187.
- Loffert D, Karger S, Twieling G, Ulber V, Kang J. 1999. Optimization of multiplex PCR.

- Qiagen News. 2:5–8. [http://download.bioon.com/view/upload/201110/22223313\\_6772.pdf](http://download.bioon.com/view/upload/201110/22223313_6772.pdf) [diakses 14 Des 2015].
- Nassuth A, Pollari E, Helmeczy K, Stewart S, Kofalvi SA. 2000. Improved RNA extraction and one tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extract. *J Virol Methods*. 90(1):37–49. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00211-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00211-1).
- Neil MO, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, Mc Millan ND. 2011. Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference Qubit system. *J Phys Conference Series*. 307(1):1–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>.
- Rajabu AC, Tairo F, Sseruwagi P, Rey ME, Ndunguru J. 2013. A single-tube duplex and multiplex PCR for simultaneous detection of four *Cassava Mosaic Begomovirus* species in cassava plants. *J Virol Methods*. 189(1):148–156. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.007>.
- Rustiani US, Sinaga MS, Hidayat SH, Wiyono S. 2015. Ecological characteristic of *Peronosclerospora maydis* in Java Indonesia. *Int J Sci Basic Appl Res*. 19(1):159–167.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual Ed. Ke-2*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Sharma K, Bhattacharjee R, Sartie A, Kumar PL. 2013. An improved method of DNA extraction from plants for pathogen detection and genotyping by polymerase chain reaction. *Afr J Biotech*. 12(15):1894–1901. DOI: 10.5897/AJB12.2096.
- Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. 2007. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carry over contamination. *Bio Techniques*. 42:186–192. DOI: <http://dx.doi.org/10.2144/000112327>.
- Suzuki S, Taketani H, Kusumoto KI, Kashiwagi Y. 2006. High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *J Bios Bioeng*. 102(6):572–574. DOI: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.102.572>.
- Tan SC, Yiap BC. 2009. Review article DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotech*. 2009:1–10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2009/574398>.
- Warburton ML, Hoisington D. 2001. Applications of molecular markers technique to the use of international germplasm collection. Di dalam: Henry RJ, editor. *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. Wallingford (UK): CABI Publishing. Hlm 89–93.
- Whatman Inc. 2002. FTA® Protocols: collect, transport, archive and access nucleic acids – all at room temperature. WB120047. [www.laboplus.pl/images/.../fta/fta\\_protocols.pdf](http://www.laboplus.pl/images/.../fta/fta_protocols.pdf) [diakses 20 Okt 2015].