

Perbandingan Teknik Isolasi DNA pada Daun dan Kayu Sonokeling (*Dalbergia latifolia*)

Susila^{1*}, I Putu Gede P. Damayanto¹, Kusumadewi Sri Yulita², Nawwall
Arrofaha³

¹Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN),
Cibinong, Kabupaten Bogor, Indonesia

²Pusat Riset Ekologi dan Etnobiologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong,
Kabupaten Bogor, Indonesia

³Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta,
Tangerang Selatan, Indonesia

*susilabot@gmail.com

Diterima: 25 Januari 2024 | Disetujui: 29 Februari 2024

ABSTRAK

Sonokeling (*Dalbergia latifolia*) merupakan tumbuhan berkayu keras, tahan terhadap serangan rayap, kayunya memiliki serat dan tekstur bermotif indah, sehingga banyak dimanfaatkan untuk *furniture* pada katagori mewah yang bernilai ekonomi tinggi. Menurut CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), status perdagangan sonokeling termasuk dalam *appendix II*. Dalam perdagangan kayu sonokeling, baik pada tingkat pasar domestik maupun internasional, untuk mengidentifikasi asal-usul kayu sonokeling tersebut relatif banyak ditemukan kendala dan kesulitan. Referensi tentang identitas kayu berdasarkan lokasi asal sangat penting dibangun sebagai salah satu upaya untuk mencegah perdagangan liar, yaitu dengan cara menggunakan pendekatan identifikasi berbasis molekuler (sidik DNA). Pada isolasi DNA kayu sonokeling diperlukan teknis khusus karena karakteristik kayunya keras. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan teknik isolasi DNA dari kayu dan daun sonokeling menggunakan protokol CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dan protokol kit komersial. Penelitian menggunakan metode identifikasi berbasis biologi molekuler. Hasil PCR menunjukkan bahwa protokol isolasi DNA menggunakan kit komersial mengungguli protokol CTAB untuk sampel daun dan kayu. Isolasi DNA dari sampel kayu lebih sukar dilakukan daripada sampel daun. Secara keseluruhan, protokol terbaik untuk isolasi DNA dari daun dan kayu sonokeling adalah dengan menggunakan kit komersial.

Kata Kunci: CTAB, CITES, ekstraksi DNA, kit, PCR

Comparison of Techniques of DNA Isolation on Leaves and Woods of Rosewood (*Dalbergia latifolia*)

ABSTRACT

Rosewood (*Dalbergia latifolia*) is a hardwood plant, resistant to termite attack, its wood has beautiful patterned fibers and textures, so it is widely used for furniture in luxury categories with high economic value. According to CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), rosewood trade status is included

in appendix II. In the trade of rosewood in both domestic and international markets, there are relatively many obstacles and difficulties in identifying the origin of rosewood. It is very important to establish a reference on the identity of wood based on the location of origin as an effort to prevent illegal trade, namely by using a molecular-based identification approach (DNA fingerprinting). In the isolation of rosewood DNA, special techniques are required due to its hard wood characteristics. This study aims to compare DNA isolation techniques from wood and leaves of rosewood using the CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) protocol and the commercial kit protocol. The research used molecular biology-based identification methods. PCR results showed that the DNA isolation protocol using the commercial kit outperformed the CTAB protocol for both leaf and wood samples. DNA isolation from wood samples was more difficult than leaf samples. Overall, the best protocol for DNA isolation from rosewood leaves and wood was to use a commercial kit.

Keywords: CTAB, CITES, DNA extraction, kit, PCR

PENDAHULUAN

Di Indonesia *Dalbergia latifolia* Roxb. (Fabaceae: Papilionaceae), dikenal sebagai sonokeling, *sonobrit*, atau *sonosungu* (Yulita *et al.*, 2020) dan dalam bahasa Inggris dikenal dengan nama *rosewood* (CITES, 2022). Sonokeling merupakan spesies tanaman pohon yang termasuk dalam keluarga polong-polongan dan tumbuh baik di daerah tropis dan subtropis di India, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, Indonesia, Malaysia, Myanmar, Vietnam, Filipina, Singapura, Reunion, Mauritius, Uganda, Tanzania, Kenya, dan Nigeria (Arunkumar *et al.*, 2021). Di Indonesia sendiri, diduga sonokeling diintroduksi dari India pada era kolonial (Adema *et al.*, 2016), kemudian dapat dijumpai di Kalimantan (Adema *et al.*, 2016), Jawa, Sumatra Selatan, Sulawesi, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur (Timor) (Yulita *et al.*, 2020). Sonokeling biasanya ditanam di hutan rakyat dan kebun masyarakat (Riastiwi *et al.*, 2022) atau di area agroforestri (Mulyana *et al.*, 2017), khususnya di hutan jati dengan tanah lempung berbatu kapur (Adema *et al.*, 2016).

Kayu sonokeling memiliki karakter sangat keras dan bercorak indah (Dwianto *et al.*, 2019), oleh karena itu sebagian besar digunakan dalam industri kerajinan, ukiran, peralatan dapur, furnitur, alat musik, bahkan sebagai bahan campuran obat-obatan (Adema *et al.*, 2016; Nagaraj *et al.*, 2020; Arunkumar *et al.*, 2021; Deshmukh *et al.*, 2021; Latif, 2021; Tiwari & Choudhary, 2021). Kayu sonokeling sangat diminati di pasar internasional dan banyak diekspor ke negara Tiongkok dan Eropa. Perdagangan kayu sonokeling di pasar internasional diatur dalam Konvensi Perdagangan Internasional Spesies Satwa dan Tumbuhan Liar Terancam Punah (CITES). Sonokeling termasuk dalam daftar apendiks II CITES sejak tahun 2017 (CITES, 2022). Kendati perdagangannya sudah diatur dalam CITES, permintaan kayu sonokeling masih begitu banyak di pasar internasional. Selain pasar internasional, harga kayu sonokeling di dalam negeri juga melonjak melebihi harga kayu jati. Akibatnya kayu ini menjadi sasaran penebangan dan perdagangan liar (Riastiwi & Damayanto, 2022). Padahal sonokeling telah ditetapkan sebagai tumbuhan terancam dengan kategori rentan atau *vulnerable* (VU) oleh IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) (IUCN, 2012). Hal ini terjadi sebagai akibat pemanfaatan sonokeling yang tinggi (Kher *et al.*, 2021; Lakhey *et al.*, 2022), kerusakan habitat, dan laju pertumbuhan sonokeling yang cukup lambat (Lakhey *et al.*, 2022).

Perdagangan kayu sonokeling belum diatur secara khusus oleh pemerintah Indonesia, namun sudah ada Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Nomor 20 Tahun 2022 tentang Peredaran Hasil Hutan Kayu yang tercantum dalam Apendiks CITES. Peredaran perdagangan kayu sonokeling di Indonesia relatif sulit dilacak tentang asal-usulnya, bahkan pemberitaan sonokeling dalam portal berita daring didominasi oleh topik kriminal (pembalakan dan peredaran kayu secara ilegal) (Riastiwi & Damayanto, 2022). Oleh karena itu, perlu upaya untuk mengetahui asal usul kayu sonokeling yang beredar di Indonesia, salah satunya dengan membangun pustaka referensi kayu sonokeling Indonesia melalui pendekatan molekuler, yaitu sidik DNA. Pendekatan ini merupakan salah satu upaya untuk mencegah perdagangan liar kayu sonokeling. Pangkalan data DNA ini dibangun dengan melakukan analisis DNA terhadap sampel-sampel sonokeling yang berasal dari berbagai lokasi

tempat tumbuh sonokeling. Namun demikian, kayu sonokeling terkenal sangat keras (Dwianto *et al.*, 2019) bahkan jauh lebih keras dari kayu jati, sehingga dibutuhkan teknik khusus untuk mengekstrak dan mengisolasi DNA dari kayu sonokeling. Inilah yang menjadi dasar dilakukannya penelitian ini.

Pada tumbuhan, isolasi DNA dapat dilakukan pada berbagai jaringan, misalnya daun dan ranting, termasuk pada jaringan kayu yang keras sekalipun, seperti pada kayu sonokeling. Pada saat ini sudah banyak dikembangkan berbagai teknik isolasi DNA seperti menggunakan teknik dasar CTAB (Murray & Thompson, 1980; Doyle & Doyle, 1987; Rogers & Bendich, 1989; Doyle, 1991; Lodhi *et al.*, 1994) dan juga perangkat/kit komersial untuk isolasi DNA misalnya Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid) dan Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Yulita *et al.*, 2020, 2022a, 2022b, 2022c; Hong *et al.*, 2022; Marinček *et al.*, 2022; Riastiwi *et al.*, 2022; Şapcı-Selamoğlu, 2022; Cunill-Flores *et al.*, 2023; Jihong *et al.*, 2023; Guillardín & MacKay, 2023). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan teknik isolasi DNA yang berasal dari jaringan kayu dan daun sonokeling dengan menggunakan teknik dasar CTAB dan kit komersial, dan untuk mendukung kegiatan pengembangan pangkalan data DNA sonokeling. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap teknik yang paling sesuai digunakan untuk isolasi DNA sonokeling dan spesies tumbuhan lainnya yang memiliki karakteristik kayu mirip dengan sonokeling.

METODE PENELITIAN

Waktu, Tempat, dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan September 2023 dengan lokasi di Laboratorium Sistematika Molekuler Tumbuhan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Penelitian dilakukan dengan metode identifikasi berbasis biologi molekuler yang menggunakan dua protokol isolasi DNA yaitu protokol CTAB dari Doyle & Doyle (1987) dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid).

Sampel dan Cara Kerja

Sampel yang digunakan untuk ekstraksi DNA sonokeling berupa daun muda dan kayu hasil survei lapangan yang telah tersimpan dalam silika gel. Sampel daun sonokeling yang digunakan adalah sebanyak 0,02 g dan sampel kayu sebanyak 0,06 g. Total jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian masing-masing sebanyak 15 sampel daun dan kayu sonokeling (Tabel 1).

Isolasi DNA dengan protokol CTAB

Sampel kayu 0,06 g atau sampel daun 0,02 g dicampur dengan pasir kuarsa dan digerus menjadi bubuk halus menggunakan lumpang dan alu. Serbuk halus dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, kemudian ditambahkan *buffer* berupa 700 µL larutan CTAB dan 14 µL mercaptoetanol. Sampel dihomogenkan dengan alat *vortex*, lalu diinkubasi dalam *waterbath* selama minimal 3 jam pada suhu 65°C untuk sampel kayu, sementara untuk sampel daun diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C. *Microtube* dibalik setiap 30 menit untuk memastikan campuran mendapat suhu yang merata. Sebanyak 500 µL kloroform-isoamil alkohol (24:1) ditambahkan ke dalam *microtube*, dibolak-balik hingga homogen, lalu disentrifugasi selama 5 menit pada 10.000 *revolutions per minute* (rpm). *Supernatant* diambil dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL yang baru menggunakan mikropipet. Proses ini diulang sebanyak dua kali. Sebanyak 500 mL isopropanol dingin ditambahkan ke dalam *supernatant* dan dicampur kemudian disimpan di dalam lemari pendingin semalaman. Pada hari berikutnya, sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Cairan bagian atas (*supernatant*) dibuang pelan-pelan agar *pellet* DNA yang ada pada dasar *microtube* tidak ikut terbang. *Microtube* dimiringkan sedikit, pinggiran *microtube* diseka menggunakan kertas *Kimwipes* agar sisa-sisa isopropanol hilang. Sebanyak 500 mL etanol 70% alkohol dingin ditambahkan, lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit dan cairannya dibuang. *Pellet* atau endapan DNA dikeringkan pada suhu ruang selama 30 menit (dengan tutup *microtube* terbuka, kemudian bagian atasnya ditutup menggunakan kertas

Kimwipes), setelah kering ditambahkan *nuclease free water* sebanyak 20–50 μL . *Microtube* dijentikkan dan DNA hasil isolasi kemudian digunakan untuk PCR.

Tabel 1. Sampel daun dan kayu sonokeling yang digunakan dalam penelitian

Kode sampel	Sampel daun		Sampel kayu	
	Nomor koleksi	Asal koleksi	Nomor koleksi	Asal koleksi
1	SN2pup4.4	Bima, NTT	1	Blitar, Jawa Timur
2	SN5pup4.4	Bima, NTT	2	Kota Batu, Jawa Timur
3	SN7pup4.4	Bima, NTT	3	Magelang, Jawa Tengah
4	RW	Bima, NTT	4	Sragen, Jawa Tengah
5	IPGPD 1054	Lombok Tengah, NTB	5	Kebumen, Jawa Tengah
6	IPGPD 1055	Lombok Tengah, NTB	Lm.1C	Majalengka, Jawa Barat
7	IPGPD 1056	Lombok Barat, NTB	S.1C	Sumedang, Jawa Barat
8	IPGPD 1058	Lombok Barat, NTB	KR.1C	Kebun Rakyat, Jawa
9	IPGPD 1059	Lombok Barat, NTB	PWL.1C	Gresik, Jawa Timur
10	SN1pup4.3	Lombok Barat, NTB	S.1B	Sumedang, Jawa Barat
11	SN2pup4.3	Lombok Barat, NTB	Lm.2C	Majalengka, Jawa Barat
12	SN3pup4.3	Lombok Barat, NTB	S.3C	Sumedang, Jawa Barat
13	SN4pup4.3	Lombok Barat, NTB	S.4C	Sumedang, Jawa Barat
14	SN5pup4.3	Lombok Barat, NTB	S.4B	Sumedang, Jawa Barat
15	SN3pup4.1	Lombok Barat, NTB	KT.1C	Gresik, Jawa Timur

Keterangan: NTB = Nusa Tenggara Barat, NTT = Nusa Tenggara Timur

Isolasi DNA dengan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant

Sampel kayu 0,06 g atau sampel daun 0,02 g dicampur dengan pasir kuarsa dan digerus menjadi bubuk halus menggunakan lumpang dan alu, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *microtube* 1,5 mL. Sebanyak 400 μL *buffer* GPX1 dan 5 μL RNase A dimasukkan ke dalam *microtube* dan kemudian dicampur dengan alat *vortex*. Campuran diinkubasi pada 60°C selama 10 menit. Selama inkubasi, campuran dibolak-balik setiap 5 menit. Sebanyak 100 μL *buffer* GP2 dimasukkan dalam campuran dan dihomogenkan dengan alat *vortex* kemudian diinkubasi dalam es selama 3 menit. Campuran disentrifugasi selama 5 menit pada 13.000 rpm (jumlah rpm dimodifikasi dari protokol asli). Kolom filter ditempatkan dalam tabung koleksi 2 mL kemudian campuran dipindahkan ke dalam kolom filter. Campuran disentrifugasi selama 1 menit pada 3.500 rpm kemudian kolom filter dibuang. *Supernatant* dipindahkan dari tabung koleksi 2 mL ke *microtube* 1,5 mL yang baru. Sebanyak 1,5 volume *buffer* GP3 yang sudah ditambahkan isopropanol dimasukkan ke dalam campuran kemudian segera dihomogenkan dengan alat *vortex* selama 5 detik. Kolom GD ditempatkan dalam tabung koleksi 2 mL. Sebanyak 700 μL campuran (dan sisa endapan) dimasukkan ke kolom GD. Campuran disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit. Kolom GD diangkat dari tabung koleksi dan cairan pada dasar tabung koleksi dibuang lalu kolom GD ditempatkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 mL. Campuran yang tersisa dimasukkan ke kolom GD kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit. Kolom GD diangkat dari tabung koleksi dan cairan pada dasar tabung koleksi dibuang lalu kolom GD ditempatkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 mL. Sebanyak 400 μL *buffer* W1 ditambahkan ke dalam kolom GD kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Kolom GD diangkat dari tabung koleksi dan cairan di dasar tabung koleksi dibuang lalu kolom GD ditempatkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 mL. Sebanyak 600 μL *wash buffer* yang telah ditambahkan etanol dimasukkan ke kolom GD kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Kolom GD diangkat dari tabung koleksi dan cairan pada dasar tabung koleksi dibuang lalu kolom GD ditempatkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 mL kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada 13.000 rpm untuk mengeringkan matriks kolom. Kolom GD diangkat dan dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL yang baru dan ditambahkan 80 μL *buffer* elusi (yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 60°C) ke tengah matriks kolom GD dan didiamkan

selama 3-5 menit untuk memastikan *buffer* elusi terserap sempurna kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik untuk mengelusi DNA. DNA hasil isolasi kemudian digunakan untuk PCR.

Elektroforesis

DNA hasil isolasi divisualisasi menggunakan 1% agarosa untuk melihat kualitas DNA yang dihasilkan. Sebanyak 0,2 g agarosa ditambahkan 20 mL 1× *buffer* TBE kemudian dipanaskan dalam *microwave* selama 1 menit. Gel ditambahkan 0,5 µL pewarna gel asam nukleat setelah agak dingin. Gel dituang dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir. Setelah mengental, sisir dicabut sehingga terlihat sumur gel. Gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah berisi *buffer* TBE hingga gel tenggelam. Sebanyak 2 µL DNA sampel dicampur dengan 1 µL *loading dye*. Campuran dimasukkan ke dalam sumur gel. Salah satu sumur dimasukkan DNA *ladder* 1 kb sebanyak 2 µL sebagai markah. Mesin elektroforesis dialiri listrik pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Pita DNA diamati dan dilakukan pemotretan menggunakan sistem dokumentasi gel (Bioinstrument, ATTO Biosystems Inc.).

PCR

Hasil isolasi DNA dengan dua protokol kemudian diverifikasi dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan markah intron *trnG* (*forward* 5'- GCG GGT ATA GTT TAG TGG TAA -3' dan *reverse* 5'- TCC ACT YGG TTT CAG ACT TGG -3') dan *petD-rpoA* (*forward* 5'- AAA TTC CAA AAT CCM TTT CGT C -3' dan *reverse* 5'- AAT GGA AGT TTA ACY CCT AA -3'). Pada sampel daun, amplifikasi PCR dilakukan dalam volume 12,5 µL, berisi 6,25 µL 1× PCR master mix (My taq HS Red Mix 2x), 0,25 µL primer *forward*, 0,25 µL primer *reverse*, 1 µL templat DNA, dan 4,75 µL *nuclease-free water*. Pada sampel kayu, amplifikasi PCR dilakukan dalam volume 13,5 µL, berisi 6,25 µL 1× PCR KOD fx, 2,5 µL dNTPs, 0,375 µL primer *forward*, 0,375 µL primer *reverse*, 0,25 µL Taq DNA polymerase, 1 µL templat DNA, dan 2,75 µL *nuclease-free water*. Siklus PCR pada alat *thermo cycler* (Wealtec) pada sampel daun dan kayu untuk markah intron *trnG*, yaitu (1) denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 3 menit; (2) denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 49°C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 90 detik (diulang sebanyak 35 siklus); dan (3) elongasi akhir pada suhu 72°C selama 4 menit (sebanyak satu kali). Sementara itu, siklus PCR pada sampel daun dan kayu untuk markah *petD-rpoA*, yaitu (1) denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 3 menit; (2) denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 48°C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 90 detik (diulang sebanyak 35 siklus); dan (3) elongasi akhir pada suhu 72°C selama 4 menit (sebanyak satu kali).

Elektroforesis hasil PCR

Produk amplifikasi divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% yang diwarnai dalam Biotium GelRed yang dijalankan secara elektroforesis dalam *buffer* TBE 0,5× pada tegangan 100 volt selama 30 menit, kemudian difoto menggunakan sistem dokumentasi gel. Data dianalisis dan disajikan secara deskriptif.

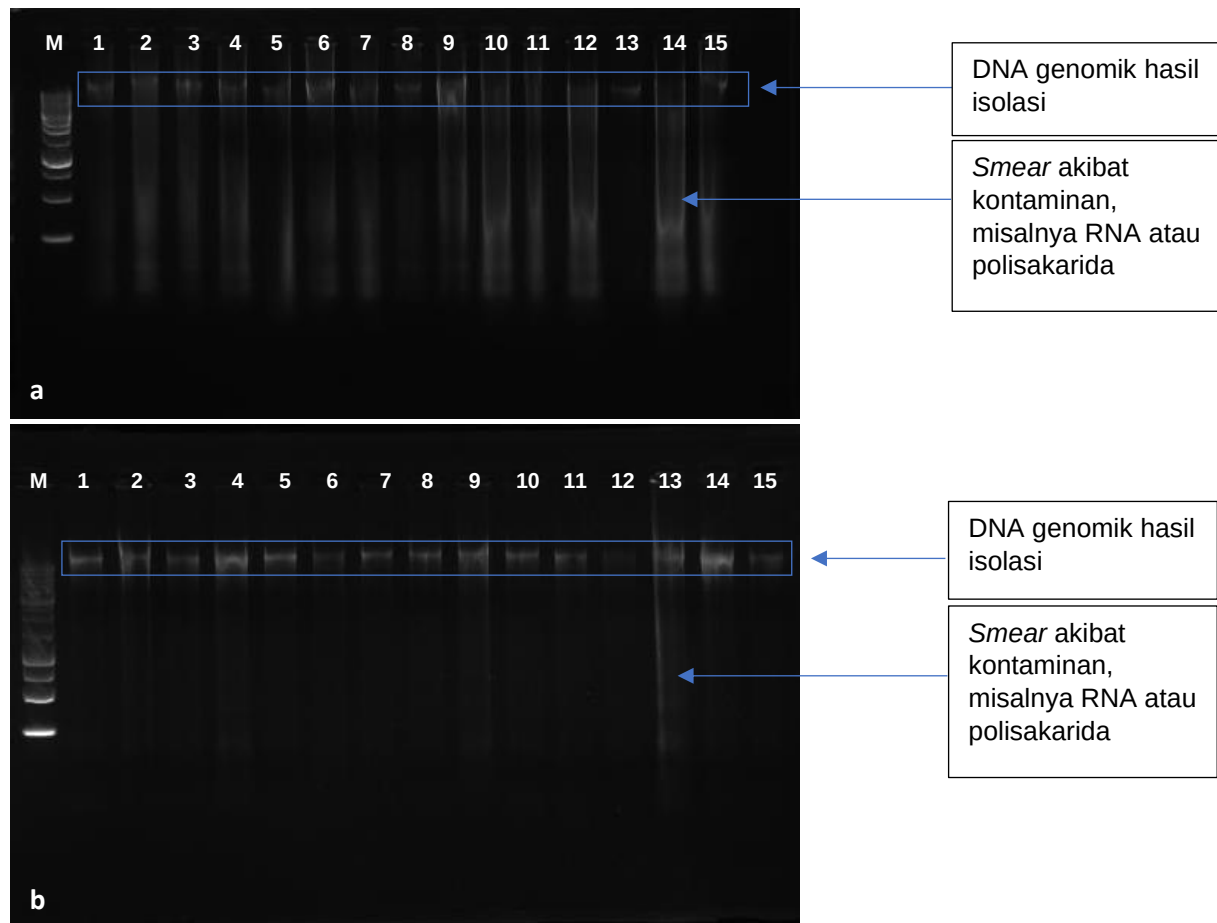
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas DNA sonokeling

Sampel kayu yang digunakan dalam isolasi DNA terlihat lebih banyak (0,06 g) dibandingkan dengan sampel daun (0,02 g). Hal ini terjadi karena kayu mengandung lebih sedikit DNA dibanding jaringan daun. Daun memiliki sel-sel hidup yang lebih padat dibandingkan dengan kayu yang umumnya terdiri dari sel-sel mati dengan dinding sel yang tebal (Haroen & Dimyati, 2006), sehingga kandungan DNA utuh pada sel-sel hidup daun lebih tinggi (Varma *et al.*, 2007).

Kualitas DNA pada sampel daun dan kayu sonokeling hasil ekstraksi dari dua protokol (protokol CTAB dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant) telah divisualisasi dengan menggunakan gel agarosa (Gambar 1 dan 2). Sebagian besar DNA yang diisolasi dari sampel daun sonokeling menggunakan protokol CTAB (Gambar 1a) dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant (Gambar 1b) memperlihatkan

pita DNA tunggal yang cukup terang dan bersih, kendati terdapat sedikit kontaminasi yang ditunjukkan dengan adanya *smear* (pita tersebar dan kabur sehingga memiliki tampilan yang buram) yang diakibatkan oleh kontaminan berupa RNA dan/atau polisakarida. Secara umum, hasil visualisasi isolasi DNA yang baik dalam gel elektroforesis adalah dapat terlihat dengan jelas dan tidak ada pita tambahan yang muncul di sekitar pita utama. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolasi berhasil memisahkan DNA target dari kontaminan atau fragmen DNA lainnya. Selain itu, pita DNA harus memiliki ukuran yang sesuai dengan yang diharapkan berdasarkan isolasi DNA target. Berdasarkan Gambar 1a dan 1b, pita DNA berada pada ukuran sekitar 10.000 bp. Pita DNA yang diperoleh dalam penelitian ini juga tidak menunjukkan adanya degradasi DNA yang signifikan, karena hanya dijumpai pita tunggal utama.



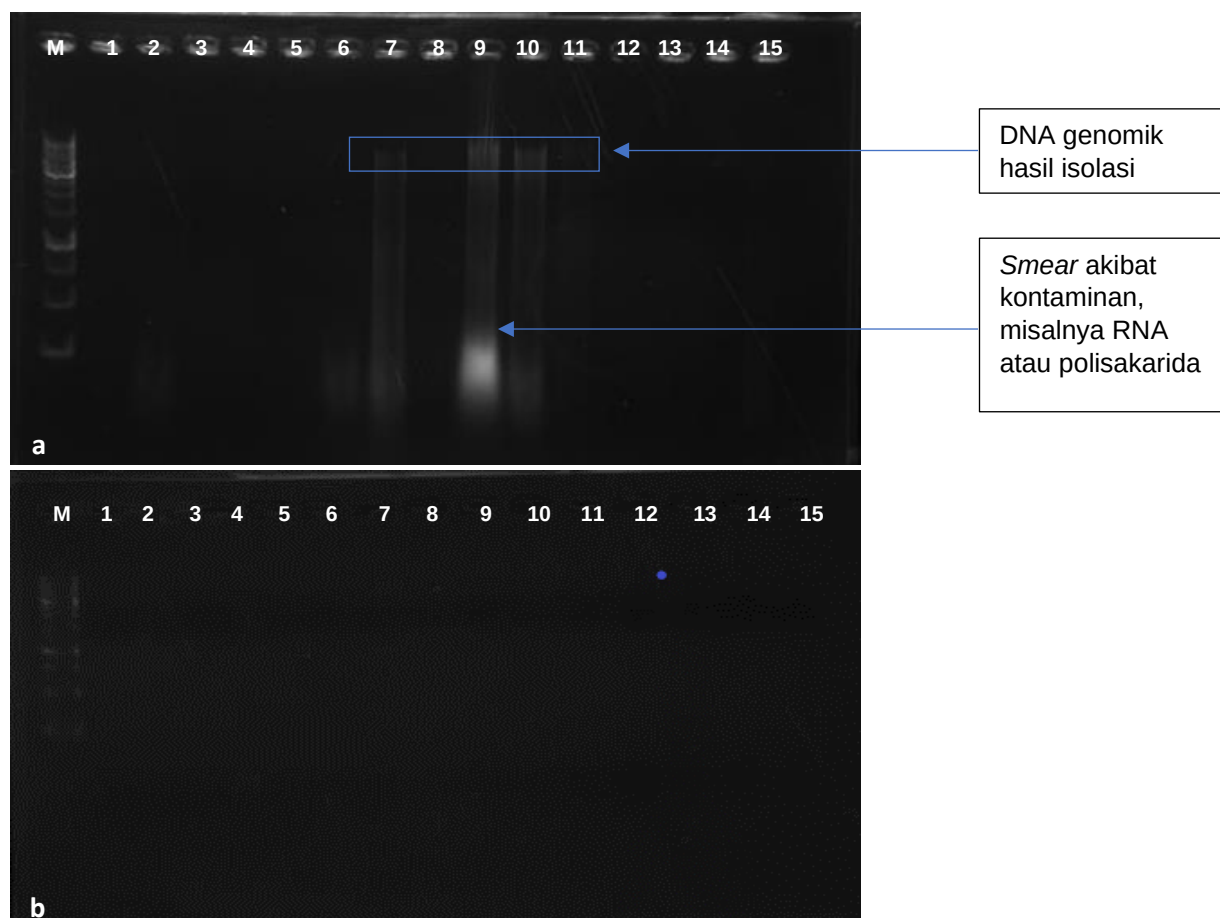
Gambar 1. Visualisasi DNA pada sampel daun sonokeling menggunakan protokol CTAB (a) dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant (b). M = DNA *ladder* 1 kb; 1–15 = sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).

Jika diperhatikan lebih seksama, DNA daun sonokeling hasil isolasi menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant jauh lebih baik dibandingkan dengan menggunakan protokol CTAB. Pita DNA pada protokol CTAB terlihat tidak muncul atau kurang jelas pada sebagian sampel (misalnya sampel nomor 12 hingga 15). Selain itu, *smear* yang muncul pada DNA hasil isolasi menggunakan protokol CTAB terlihat lebih banyak dan lebih jelas (misalnya pada sampel 5, 6, dan 8) dibandingkan dengan pita DNA pada isolasi menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant. Ada beberapa kemungkinan isolasi DNA menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant menghasilkan DNA yang lebih baik dibandingkan dengan protokol CTAB. Pertama, protokol Genomic DNA Mini Kit Plant dan protokol CTAB memiliki komposisi reagen dan langkah-langkah pengolahan yang berbeda, sehingga memengaruhi hasil isolasi DNA. Kedua, protokol CTAB lebih rentan mengalami kesalahan teknis, misalnya adanya kekeliruan dalam pembuatan *buffer* CTAB akibat dilakukan secara manual.

Sementara itu, *buffer* pada protokol Genomic DNA Mini Kit Plant sudah tersedia secara pabrikan sehingga mengurangi faktor kesalahan teknis peracikan *buffer*. Ketiga, reagen kimia yang kedaluwarsa atau disimpan dengan tidak benar juga dapat menghasilkan DNA yang kurang optimal. Keempat, faktor lingkungan seperti kelembaban, suhu, atau kondisi lainnya selama proses isolasi DNA, juga dapat memengaruhi hasil akhir.

Berdasarkan Gambar 2a dan 2b, sebagian besar DNA genomik yang diisolasi dari sampel kayu sonokeling menggunakan protokol CTAB (Gambar 2a) dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant (Gambar 2b) tidak memperlihatkan pita DNA tunggal yang terang. Bahkan isolasi DNA menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant terlihat tidak menghasilkan pita DNA sama sekali (Gambar 2b). Kendati demikian, beberapa sampel (misalnya sampel nomor 7, 9, dan 10) pada isolasi DNA kayu sonokeling menggunakan protokol CTAB masih menghasilkan pita DNA tunggal yang samar dan terlihat ada kontaminasi yang ditunjukkan dengan adanya *smear* (Gambar 2a).

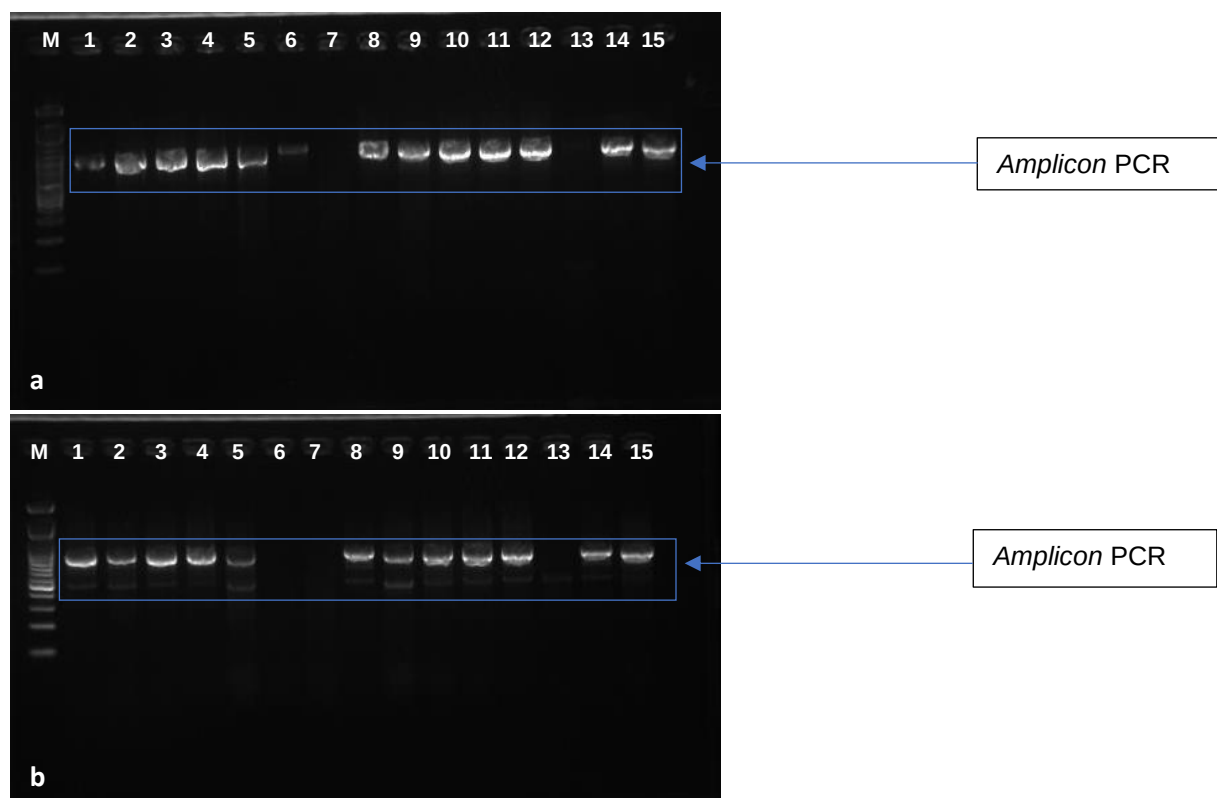
Berbeda dengan hasil isolasi menggunakan sampel daun (Gambar 1), DNA genomik dari hasil isolasi sampel kayu sonokeling menghasilkan pita DNA yang kurang jelas dan dijumpai *smear* yang cukup tinggi (Gambar 2). Dibandingkan dengan jaringan daun, kayu memiliki struktur jaringan yang lebih padat dan mengalami proses lignifikasi (Kärkönen & Koutaniemi, 2010). Selain itu, kayu juga mengandung senyawa metabolik sekunder berupa fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan daun, sehingga isolasi DNA dari jaringan kayu cenderung lebih sulit dilakukan (Fatima *et al.*, 2018). Daun, di sisi lain, mengandung sel-sel hidup dengan kepadatan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kayu yang umumnya terdiri dari sel-sel mati dengan dinding sel yang tebal (Haroen & Dimiyati, 2006). Kandungan DNA utuh pada sel-sel hidup daun lebih tinggi, sehingga proses ekstraksi cenderung lebih efisien pada daun (Varma *et al.*, 2007).



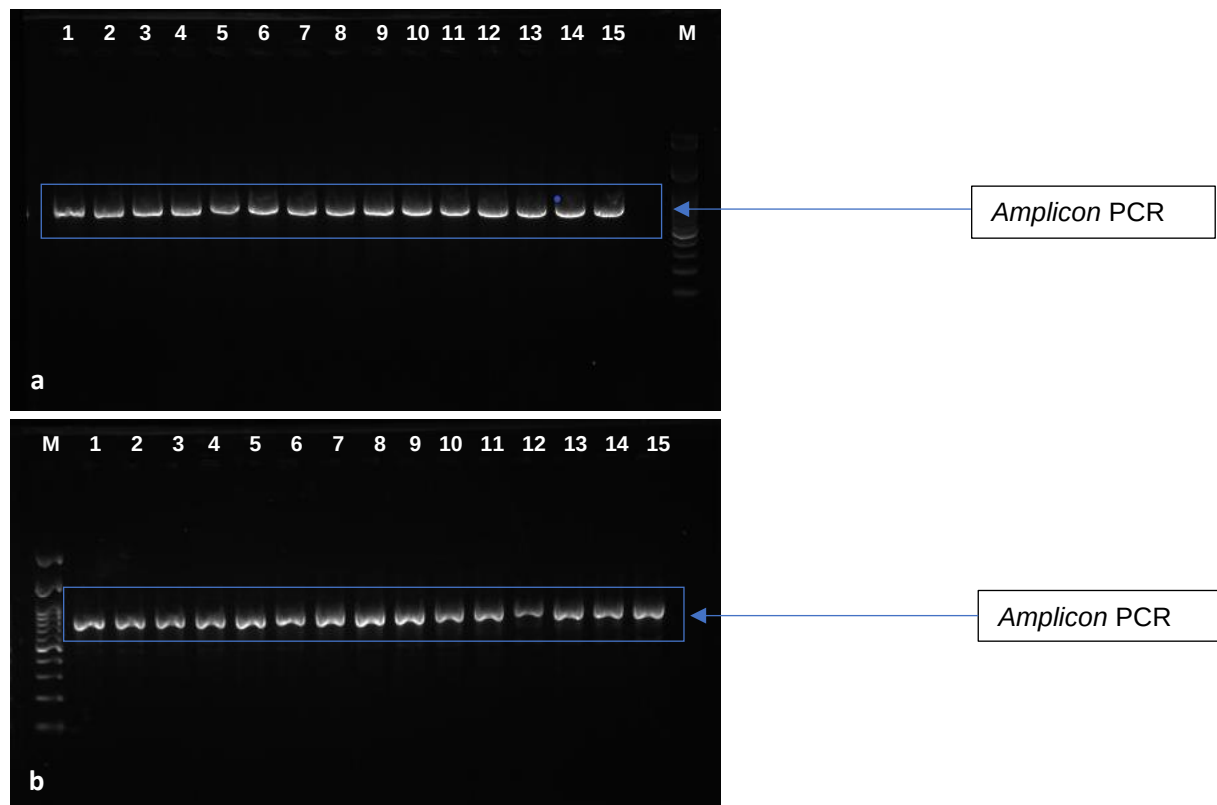
Gambar 2. Visualisasi DNA pada sampel kayu sonokeling menggunakan protokol CTAB (a) dan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant (b). M = DNA *ladder* 1 kb; 1–15 sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).

Verifikasi protokol isolasi DNA

DNA yang diisolasi dari dua protokol telah diperiksa dan diverifikasi dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan markah intron *trnG* dan *petD-rpoA* (Gambar 3–6). *Amplicon* PCR dengan markah intron *trnG* (Gambar 3a) dan *petD-rpoA* (Gambar 3b) pada sampel DNA daun sonokeling menggunakan protokol CTAB memperlihatkan pita DNA yang cukup terang, walaupun beberapa sampel (nomor 6, 7, dan 13) terlihat sangat tipis bahkan juga tidak muncul pita DNA sama sekali. Selain itu, produk amplifikasi PCR menggunakan markah *petD-rpoA* (Gambar 3b) tidak menghasilkan pita DNA tunggal, sementara markah intron *trnG* (Gambar 3a) menghasilkan pita DNA tunggal. Hal ini mungkin terjadi karena adanya variasi dalam kualitas dan kuantitas DNA pada sampel daun sonokeling. Untuk menghasilkan produk PCR yang baik, sampel DNA harus memiliki kualitas dan konsentrasi yang mencukupi (Sönmezoğlu & Keskin, 2015; Sönmezoğlu & Terzi, 2019). Beberapa sampel DNA dalam penelitian ini mungkin mengandung DNA dalam konsentrasi atau kualitas yang rendah, menyebabkan hasil amplifikasi PCR kurang terang bahkan mungkin tidak menunjukkan pita DNA sama sekali. Perbedaan dalam keberhasilan amplifikasi antara markah-markah intron *trnG* dan *petD-rpoA* dapat disebabkan oleh karakteristik genetik atau struktur primer yang digunakan dalam PCR. Mungkin ada perbedaan dalam efisiensi amplifikasi antara kedua markah tersebut, sehingga markah *petD-rpoA* tidak menghasilkan pita DNA tunggal, sementara markah intron *trnG* menghasilkan pita DNA tunggal. Selain itu, sampel DNA yang mengandung polisakarida (dapat dilihat dari *smear* yang muncul pada visualisasi DNA sampel) dapat menghambat amplifikasi PCR dan berpotensi menghasilkan interpretasi yang tidak benar (Kotchoni *et al.*, 2003; Azmat *et al.*, 2012).



Gambar 3. *Amplicon* PCR dengan markah intron *trnG* (a) dan *petD-rpoA* (b) pada sampel DNA daun sonokeling menggunakan protokol CTAB. M = DNA ladder 100 bp; 1–15 = sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).



Gambar 4. *Amplicon* PCR dengan markah intron *trnG* (a) dan *petD-rpoA* (b) pada sampel DNA daun sonokeling menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant. M = DNA *ladder* 100 bp; 1–15 = sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).

Amplicon PCR dengan markah intron *trnG* (Gambar 4a) dan *petD-rpoA* (Gambar 4b) pada sampel DNA daun sonokeling menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant memperlihatkan pita DNA tunggal yang terang pada hampir semua sampel. Berdasarkan hasil ini, isolasi DNA menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant menghasilkan produk amplifikasi PCR yang lebih baik dibandingkan dengan protokol CTAB. Hal ini sejalan dengan kualitas DNA yang dihasilkan, yaitu pada protokol Genomic DNA Mini Kit Plant menghasilkan DNA genom yang lebih berkualitas (lihat Gambar 1b, pita cukup terang dan sedikit *smear*) dibandingkan dengan protokol CTAB (lihat Gambar 1a, pita kurang terang dan banyak *smear*). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, sampel DNA yang mengandung polisakarida (terlihat *smear* pada visualisasi DNA sampel) dapat menghambat amplifikasi PCR (Kotchoni *et al.*, 2003; Azmat *et al.*, 2012). Oleh karena itu, isolasi DNA menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant dipercaya lebih efektif dalam mengurangi kontaminan berupa polisakarida karena kit tersebut menggunakan *column* khusus (kolom GD dan kolom filter, semacam "saringan") untuk memfilter kontaminan yang tidak diperlukan, selain mengandalkan gaya sentrifugasi dan zat kimia. Sementara itu, isolasi DNA menggunakan protokol CTAB hanya mengandalkan gaya sentrifugasi dan zat kimia untuk memisahkan kontaminan.

Amplicon PCR dengan markah intron *trnG* (Gambar 5a) dan *petD-rpoA* (Gambar 5b) pada sampel DNA kayu sonokeling menggunakan protokol CTAB memperlihatkan pita DNA kurang terang, beberapa sampel terlihat sangat tipis bahkan juga tidak muncul pita DNA sama sekali. Selain itu, sebagian besar *amplicon* PCR pada markah *trnG* intron menghasilkan pita DNA ganda, yang berarti templat DNA yang digunakan memiliki kualitas yang kurang baik. Pita DNA yang muncul pada *amplicon* PCR menggunakan protokol CTAB pada markah intron *trnG* (Gambar 5a) hanya 47% (7 sampel) dari total 15 sampel, sementara pita DNA yang muncul pada *amplicon* PCR menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant pada markah intron *trnG* (Gambar 6a) lebih banyak, yaitu sebesar 67% (10 sampel) dari total 15 sampel. Lebih lanjut, pita DNA yang dihasilkan *amplicon* PCR menggunakan protokol CTAB pada markah *petD-rpoA* (Gambar 5b) hanya 40% (6 sampel) dari total 15 sampel, sementara

pita DNA yang dihasilkan *amplicon* PCR menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant pada markah *petD-rpoA* (Gambar 6b) lebih banyak, yaitu sebesar 80% (12 sampel) dari total 15 sampel.

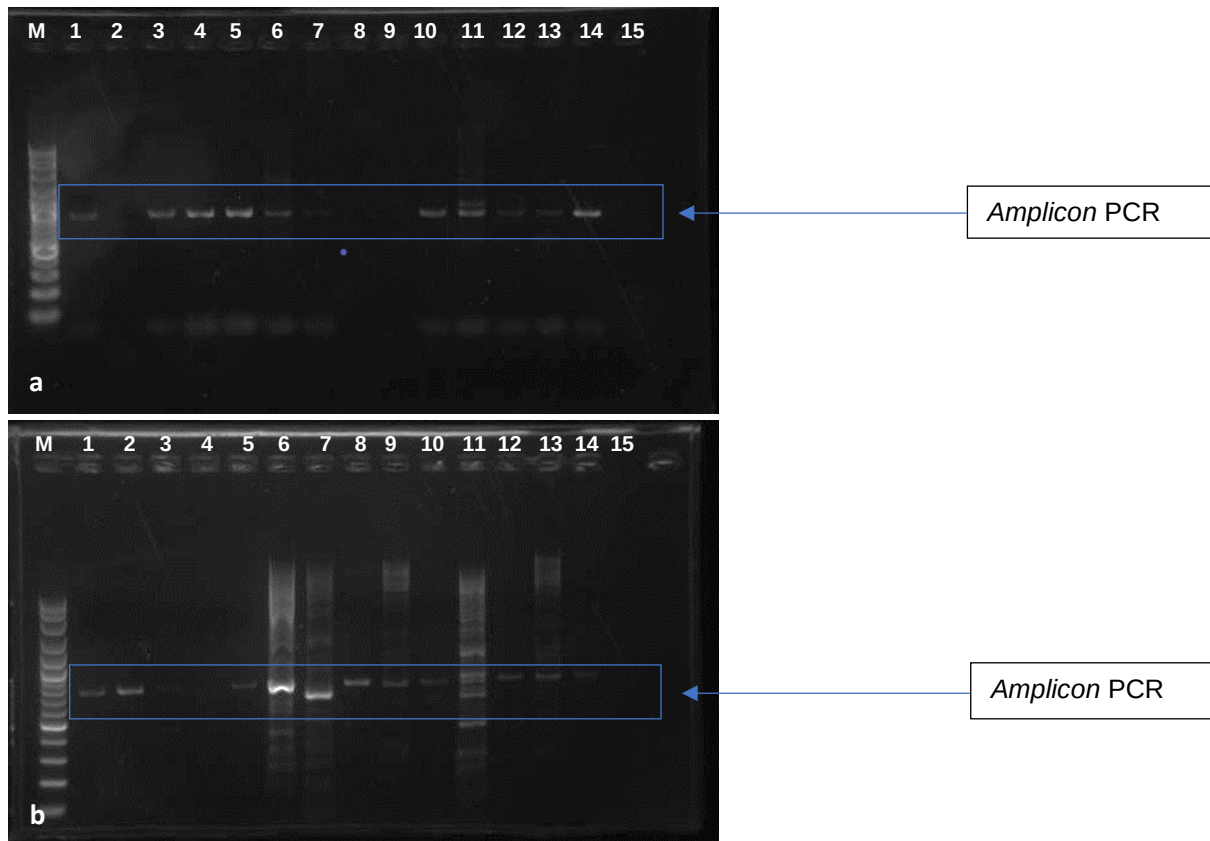
Amplicon PCR dengan markah intron *trnG* (Gambar 6a) dan *petD-rpoA* (Gambar 6b) pada sampel DNA kayu sonokeling menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant jauh lebih baik dibandingkan dengan protokol CTAB. Hal ini sejalan dengan hasil laporan Yulita *et al.* (2022a) yang menyatakan bahwa protokol terbaik untuk mengisolasi DNA kayu sonokeling adalah dengan menggunakan kit komersial. Untuk meningkatkan hasil dari protokol tersebut, perlu dilakukan lebih banyak pengujian optimalisasi kondisi PCR dan pemurnian DNA hasil isolasi (Yulita *et al.*, 2022a). Berdasarkan temuan di atas, telah disusun perbandingan keuntungan dan kerugian dari semua protokol yang ada, terlihat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan dua protokol isolasi DNA pada daun dan kayu sonokeling

Kriteria	Protokol CTAB		Protokol Genomic DNA Mini Kit Plant	
	Sampel daun	Sampel kayu	Sampel daun	Sampel kayu
Durasi	2 hari	2 hari	1 hari	1 hari
Biaya	Murah	Murah	Cukup mahal	Cukup mahal
Alat dan bahan	Sederhana	Sederhana	Sederhana	Sederhana
Jumlah sampel	0,02 g	0,06 g	0,02 g	0,06 g
Hasil isolasi DNA	Cukup bagus	Kurang bagus	Bagus	Tidak bagus
Produk PCR	Cukup bagus	Kurang bagus	Bagus	Cukup bagus



Gambar 5. *Amplicon* PCR dengan markah intron *trnG* (a) dan *petD-rpoA* (b) pada sampel DNA kayu sonokeling menggunakan protokol CTAB. M = DNA ladder 100 bp; 1–15 = sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).



Gambar 6. *Amplicon* PCR dengan markah intron *trnG* (a) dan *petD-rpoA* (b) pada sampel DNA kayu sonokeling menggunakan protokol Genomic DNA Mini Kit Plant. M = DNA ladder 100 bp; 1–15 = sampel (lihat kode sampel pada Tabel 1).

KESIMPULAN

Evaluasi kualitas DNA dari protokol CTAB dan kit komersial menunjukkan hasil yang baik meskipun ada sedikit kontaminasi. Protokol dari kit komersial efektif dalam mengurangi kontaminan polisakarida. Hasil PCR menunjukkan bahwa protokol isolasi DNA menggunakan kit komersial mengungguli protokol CTAB untuk sampel daun dan kayu. Isolasi DNA dari sampel kayu lebih susah dilakukan daripada sampel daun. Secara keseluruhan, protokol terbaik untuk isolasi DNA dari daun dan kayu sonokeling adalah dengan menggunakan kit komersial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Uni Eropa yang mendukung penelitian ini melalui Program CITES Tree Species. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional yang telah mengizinkan menggunakan fasilitas di Laboratorium Sistematika Molekuler Tumbuhan untuk melakukan kegiatan penelitian ini. Terima kasih kami haturkan kepada Sdri. Cinthya L.H. Dewi, atas bantuan teknis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Adema, F., Ohashi, H., & Sunarno, B. (2016). Notes on Malesian Fabaceae (Leguminosae-Papilionoideae) 17. The genus *Dalbergia*. *Blumea*, 61(3), 186-206.
- Arunkumar, A.N., Warriar, R.R., Kher, M.M., & Teixeira da Silva, J.A. (2021). Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.): biology, utilisation, and conservation practices. *Trees - Structure and Function*, 36(3), 883-898.

- Azmat, M.A., Khan, I.A., Cheema, H.M., Rajwana, I.A., Khan, A.S., & Khan, A.A. (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(4), 239-243.
- CITES. (2022). *Checklist of CITES species*. Diunduh pada 10 Oktober 2023, dari laman https://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=Dalbergia+latifolia&page=1&per_page=20.
- Cunill-Flores, J.M., Salgado-Escobar, I., Ramírez, D.G., Jiménez-Juárez, N., Nettel-Hernanz, A., Horta-Valerdi, G.M., Matamoros, W.A., & Pacheco Hernández, Y. (2023). Genomic DNA extraction and phenolic content of salty and tannic plant material of two mangrove tree species from the Mexican Pacific Coast. *Silvae Genetica*, 72(1), 143-149.
- Deshmukh, V.P., Lunge, M.S., Rajurkar, A.V., Dharkar, N.S., Raut, S.R., & Dhoran, V.S. (2021). Chemical characterization and therapeutics of *Dalbergia latifolia* Roxb: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(4), 340-345.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston, & J.P.W. Young (Eds.), *Molecular techniques in taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Dwianto, W., Bahanawan, A., Kusumah, S.S., Darmawan, T., Amin, Y., Pramasari, D.A., Lestari, E., Akbar, F., & Sudarmanto. (2019). Study on the existence and characteristics of Sonokeling (*Dalbergia latifolia* Roxb) as an Appendix II CITES Wood. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 374(012063), 1-6.
- Fatima, T., Srivastava, A., Hanur, V., & Rao, M. (2018). An effective wood DNA extraction protocol for three economic important timber species of India. *American Journal of Plant Sciences*, 9(2), 139-149.
- Guillardín, L., & MacKay, J. (2023). Comparing DNA isolation methods for forest trees: quality, plastic footprint, and time-efficiency. *Research Square*, 1-17.
- Haroen, W.K., & Dimyati, F. (2006). Sifat kayu tarik, teras dan gubal *Acacia mangium* terhadap karakteristik pulp. *Jurnal Selulosa*, 41(1), 1-7.
- Hong, Z., He, W., Liu, X., Tembrock, L.R., Wu, Z., Xu, D., & Liao, X. (2022). Comparative analyses of 35 complete chloroplast genomes from the genus *Dalbergia* (Fabaceae) and the identification of DNA barcodes for tracking illegal logging and counterfeit rosewood. *Forests*, 13(626), 1-16.
- IUCN (2012). IUCN red list categories and criteria, version 3.1, second edition (2nd ed.). Diunduh pada 10 Oktober 2023, dari laman <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2001-001-2nd.pdf>.
- Jihong, Z., Jiaying, W., Ying, X., Xiaoling, L., Jianhua, W., Ming, M., & Junxia, C. (2023). DNA extraction from heartwood and quick species authentication using Real-Time PCR: a case study of the rosewood (*Pterocarpus indicus*). *Journal of Plant Sciences*, 11(2), 28-34.
- Kärkönen, A., & Koutaniemi, S. (2010). Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2), 176-185.
- Kotchoni, S.O., Gachomo, E.W., Betiku, E., & Shonukan, O.O. (2003). A home made kit for plasmid DNA mini preparation. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 88-90.
- Kher, M.M., Nataraj, M., Arun-Kumar, A.N., Sitther, V., Shekhawat, M.S., Warriar, R.R., & Teixeira da Silva, J.A. (2021). Tissue culture of Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Biologia*, 76(12), 3595-3604.
- Lakhey, P., Pathak, J., & Adhikari, B. (2022). *Dalbergia latifolia*: The IUCN red list of threatened species 2020: e.T32098A67777757. Diunduh pada 10 Oktober 2023, dari laman <https://www.iucnredlist.org/species/32098/67777757>.
- Latif, B. (2021). Pemanfaatan kayu sonokeling sebagai bahan baku pembuatan bars xylophone. *Grenek Music Journal*, 10(2), 69-80.

- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., & Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- Marinček, P., Wagner, N.D., & Tomasell, S.O. (2022). Ancient DNA extraction methods for herbarium specimens: when is it worth the effort? *Applications in Plant Sciences*, 10(e11477), 1-12.
- Mulyana, L., Febryano, I.G., Safe'i, R., & Banuwa, I.S. (2017). Performa pengelolaan agroforestri di wilayah Kesatuan Pengelolaan Hutan Lindung Rajabasa. *Jurnal Hutan Tropis*, 5(2), 127-133.
- Murray, M.G., & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326.
- Nagaraj, E., Shanmugam, P., Karuppannan, K., Chinnasamy, T., & Venugopal, S. (2020). The biosynthesis of a graphene oxide-based zinc oxide nanocomposite using *Dalbergia latifolia* leaf extract and its biological applications. *New Journal of Chemistry*, 44(5), 2166-2179.
- Riastiwi, I., & Damayanto, I.P.G.P. (2022). Tren pemberitaan sonokeling dalam portal berita daring di Indonesia. *Berkala Ilmu Perpustakaan dan Informasi*, 18(2), 276-291.
- Riastiwi, I., Witjaksono, Ratnadewi, D., & Siregar, U.J. (2022). Genetic diversity of rosewood (*Dalbergia latifolia*) in Yogyakarta, Indonesia for plus trees selection. *Biodiversitas*, 23(5), 2630-2639.
- Rogers, S.O., & Bendich, A.J. (1989). Extraction of DNA from plant tissues. In S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, & D.P.S. Verma (Eds.), *Plant molecular biology manual*. Netherlands: Springer.
- Şapcı-Selamoğlu, H. (2022). DNA barcoding of two narrow endemic plants; *Astragalus argaeus* and *Astragalus stenosemioides* from Mount Erciyes, Turkey. *Conservation Genetics Resources*, 14, 81-84.
- Sönmezoğlu, Ö. A., & Keskin, H. (2015). Determination of genetically modified corn and soy in processed food products. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 3(3), 32-37.
- Sönmezoğlu, Ö. A., & Terzi, B. (2019). Comparison of DNA extraction protocols for PCR-based techniques in wheat. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 17, 860-865.
- Tiwari, A., & Choudhary, N.K. (2021). Phytopharmacological evaluation of *Dalbergia latifolia* Roxb for antidiabetic activity and its effect on lipid profile and hepatic enzymes of glucose metabolism in diabetic rats. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(3 Suppl. 2), 95-109.
- Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*, 2(3), 386-392.
- Yulita, K.S., Dwiyantri, F.G., Kamal, I., & Arrofaha, N. (2022a). *A DNA extraction protocol for wood of D. latifolia in Java and West Nusa Tenggara, Indonesia*. Directorate of Biodiversity Conservation of Species and Genetic, Ministry of Environment and Forestry, and the National Research and Innovation Agency, Indonesia.
- Yulita, K.S., Susila, Rachmat, H.H., Dwiyantri, F.G., Atikah, T.D., Subiakto, A., Pratama, B., Setyawati, T., Wardani, W., Fambayun, R.A., Arrofaha, N., & Kamal, I. (2022b). Population genetic of the Indonesian rosewood (*Dalbergia latifolia*) from Java and West Nusa Tenggara revealed using sequence related amplified polymorphism. *Forest Science and Technology*, 18(4), 172-181.
- Yulita, K.S., Susilowati, A., Rachmat, H.H., Susila, Hidayat, A., & Dwiyantri, F.G. (2022c). Molecular identification of *Eurycoma longifolia* Jack from Sumatra, Indonesia using *trnL-F* region. *Biodiversitas*, 23(3): 1374-1382.
- Yulita, K.S., Atikah, T.D., Wardani, W., & Susila. (2020). Unravelling genetic variations of *Dalbergia latifolia* (Fabaceae) from Yogyakarta and Lombok Island, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(2), 831-841.