

# Pengaruh Konsentrasi Polivinilpirolidon (PVP) terhadap Kualitas dan Kuantitas Isolasi DNA Eukariot dan Prokariot

Chika Shafa Maura<sup>1\*</sup>, Imam Safir Alwan Nurza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitas Negeri Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Institut Pertanian Bogor, Indonesia

## ABSTRACT

DNA isolation is an important step in molecular biology applications, including diagnostics and genetic research. Polyvinylpyrrolidone (PVP) is a stabilizing agent in various chemical and biological processes. The purpose of this study was to evaluate the effect of 1% and 2% PVP concentrations on the quality and quantity of eukaryotic and prokaryotic cell DNA isolation. The research method used was CTAB with PVP concentrations (1% and 2%) tested to determine optimal conditions. The DNA isolation process involves cell lysis, purification, and DNA precipitation. DNA quality was observed by electrophoresis and spectrophotometry to measure DNA concentration and purity as DNA quantity. The eukaryotes used were *Ananas comosus* var. Toboali plants and *Trichoderma* sp. fungi. At the same time, prokaryotes were *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria. The results showed that the use of PVP increased the quantity of isolated DNA without reducing its quality. Concentration of 2% PVP resulted with the appearance of bands in eukaryotic DNA isolation. Meanwhile, 1% PVP produced very good quality in prokaryotes with the appearance of sharp bands. Therefore, the use of appropriate PVP concentration can increase the efficiency and effectiveness of DNA isolation from eukaryotic and prokaryotic cells.

## ABSTRAK

Isolasi DNA merupakan tahap penting dalam aplikasi biologi molekuler, termasuk diagnostik dan penelitian genetik. Polivinilpirolidon (PVP) diketahui sebagai agen penstabil dalam berbagai proses kimia dan biologi. Tujuan penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi PVP 1% dan 2% terhadap kualitas dan kuantitas isolasi DNA sel eukariot dan prokariot. Metode penelitian yang digunakan adalah CTAB dengan konsentrasi PVP (1%, dan 2%) diuji untuk menentukan kondisi optimal. Proses isolasi DNA melibatkan lisis sel, pemurnian, dan pengendapan DNA. Kualitas DNA diamati dengan elektroforesis dan spektrofotometri untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA sebagai kuantitas DNA. Eukariot yang digunakan berupa tanaman *Ananas comosus* var. Toboali dan cendawan *Trichoderma* sp. Sedangkan prokariot berupa bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). Hasil penelitian menunjukkan penggunaan PVP meningkatkan kuantitas DNA yang diisolasi tanpa mengurangi kualitasnya. PVP 2% memberikan hasil dengan kemunculan pita pada isolasi DNA eukariot. PVP 1% memberikan kualitas yang sangat baik pada prokariot dengan kemunculan pita tegas. Oleh karena itu, penggunaan konsentrasi PVP yang tepat dapat meningkatkan efisiensi dan efektivitas isolasi DNA dari sel eukariot dan prokariot.

## KONTAK

chikamaura22@gmail.com

## KATA KUNCI

Eukariot, Isolasi DNA,  
Polivinilpirolidon, Prokariot

## PENDAHULUAN

DNA merupakan materi genetik yang digunakan untuk identifikasi spesies, biodiversitas, dan sebagai pembeda antar spesies. DNA diketahui digunakan dalam proses barcoding yang melibatkan amplifikasi dan sekuensing spesifik DNA untuk identitas suatu spesies. Materi genetik tersebut dapat menjadi penanda pada organisme eukariot dan prokariot, seperti ITS (*Internal Transcribed Spacer*) pada DNA cendawan, rbcL pada tanaman, dan 16S rRNA pada bakteri (Nilsson *et al.*, 2015; Francioli *et al.*, 2021).

Isolasi DNA merupakan proses mengekstraksi dan memurnikan DNA dari sel. Proses ini melibatkan disrupti dinding sel, lisis sel, dan pemurnian DNA. Metode isolasi DNA diketahui ada yang menggunakan penggilingan, teknik pemukulan manik, dan peralatan komersial. Ketiga metode ini bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan zat-zat yang mengganggu. Sehingga, memungkinkan dapat hasil yang baik (Conlon *et al.*, 2022; Kumar dan Mugunthan, 2018).

Tujuan isolasi DNA untuk mendapatkan DNA murni dengan berat molekul yang tinggi dari sel. Molekul ini digunakan dalam pengujian molekuler, seperti PCR, *Southern blotting*, analisis SNP, dan sekuensing. Hal ini penting untuk identifikasi dan diagnosis infeksi yang akurat. DNA yang diisolasi dapat digunakan dalam aplikasi *downstream* untuk mempelajari genetika cendawan, taksonomi, dan patogenitasnya (Almakarem *et al.*, 2012; Al-Samarrai dan Schmid, 2000).

Prinsip isolasi DNA melibatkan pemecahan sel melepaskan DNANYA dan memurnikan DNA dari komponen sel. Eukariot dan prokariot diketahui memiliki dinding sel, yang mana harus dipecahkan untuk melepaskan DNA. Berbagai cara diketahui dapat memecah dinding sel cendawan dengan mekanik, enzimatis, dan kimiawi. Pemecahan dinding sel dengan mekanik dapat dilakukan dengan penggilingan mortar. Enzimatis dengan lisozim atau selulase. Kimiawi dengan SDS (Riffiani *et al.*, 2021; Aamir *et al.*, 2015). Sel yang terdisrupsi dan lepas DNANYA dilakukan presipitasi. Presipitasi diketahui untuk meningkatkan konsentrasi DNA dan menghilangkan kontaminan. Presipitasi dapat dilakukan dengan larutan isopropanol atau etanol. Purifikasi dan pencucian untuk menghilangkan sisa kontaminan. DNA yang telah dimurnikan diresuspensi dengan larutan atau buffer yang sesuai seperti buffer TE (Tris-EDTA). Buffer TE diketahui dapat menstabilkan DNA dan menjaga integritasnya untuk aplikasi *downstream* (Galliano *et al.*, 2021; Branton dan Deamer, 2019).

Salah satu komponen dalam prinsip isolasi DNA ada penggunaan PVP (polivinilpirolidon). Reagen ini digunakan sebagai larutan lisis untuk menghilangkan senyawa polifenol dan menjaga stabilitas DNA pada organisme selama isolasi (Boldura *et al.*, 2020). PVP diteliti pada isolasi DNA eukariot dan prokariot berdasarkan konsentrasinya untuk mengetahui kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh. PVP juga diketahui digunakan dalam protokol isolasi DNA. Sehingga, tujuan penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi PVP dari protokol pada kualitas dan kuantitas DNA eukariot dan prokariot.

## METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode CTAB dengan konsentrasi PVP 1% dan 2%. Konsentrasi PVP 1% pada prokariot (bakteri *Escherichia coli*) dan 2% pada eukariot (tanaman *Ananas comosus* var. *Toboali* dan cendawan *Trichoderma* sp). Metode CTAB digunakan sebagai *buffer* untuk melisis membran sel dan mempermudah DNA lepas dari komponen sel.

Penelitian ini dilakukan dengan menyiapkan sampel daun, sampel cendawan, dan sampel bakteri. Setiap sampel dilakukan sebanyak lima ulangan teknis. Sampel daun dan cendawan masing-masing digerus dengan nitrogen cair. Sedangkan sampel bakteri diambil sebanyak 1,5 ml ke dalam *tube*. *Tube* disentrifugasi 10.000 rpm selama lima menit. Sampel daun dan cendawan masing-masing diberi larutan *buffer* CTAB 600  $\mu$ l dan PVP 2% yang sudah diinkubasi pada suhu 65°C. Sampel daun ada penambahan dengan 0.2% 2-mercaptoetanol. Sampel bakteri peletnya diambil dan diberi larutan *buffer* CTAB 600  $\mu$ l dan 1% PVP.

Isolasi DNA sampel daun, cendawan, dan bakteri diresuspensi dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit (setiap 10 menit dibolak-balik). Lalu, didinginkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sampel ditambahkan larutan C:I (24:1) 600  $\mu$ l dan dibolak-balik sebanyak 10X. Kemudian, disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 20°C selama 10 menit. Supernatan (fase atas) diambil dengan *pipetting* dan ditambahkan larutan P:C:I (25:24:1) sebanyak 1X volume, kecuali sampel bakteri. Sampel daun dan cendawan dibolak-balik kurang lebih sebanyak 10X dan disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 20 °C selama 10 menit. Supernatan (fase atas) sampel daun, cendawan dan bakteri diambil dengan cara *pipetting* dan ditambahkan larutan NaOAc 2 M sebanyak 0.1X volume dan ETOH 100% sebanyak 2-3X volume. Sampel dibolak-balik sebanyak 10X dan disimpan dalam *freezer* semalaman. Kemudian, sampel disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 25 menit. Pelet diambil dan ditambahkan larutan EtOH 70% 500  $\mu$ l. Kemudian, disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet diambil dan dikeringkan dengan selama 25 menit. Sampel ditambahkan larutan ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ l dan larutan RNase 0.2X volume. Lalu, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit.

Analisis kualitatif dilakukan dengan pengamatan elektroforesis. Elektroforesis dilakukan melalui pembuatan gel agarosa 1% dengan mencampurkan 0.2 g agarosa dan 20 ml *buffer* TAE. Kemudian, dipanaskan dengan *microwave* sampai bening dan tunggu hangat. Lalu, dituangkan ke dalam cetakan. Cetakan berisi gel dimasukkan ke dalam elektroforesis dan ditambahkan *buffer* TAE sampai gel tenggelam. Kemudian, sampel DNA tanaman diambil 5  $\mu$ l dan ditambahkan dengan larutan *loading dye* 1  $\mu$ l. Keduanya diresuspensi dengan cara *pipetting*. Lalu, dimasukkan ke dalam elektroforesis. DNA marker Lambda dimasukkan 3  $\mu$ l. Setelah itu, dijalankan elektroforesis dengan 100 volt selama 30 menit. Gel direndam dengan larutan EtBr selama 15 menit dan divisualisasikan dengan UV transiluminator.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan pengamatan spektrofotometer UV-VIS. Pengamatan dilakukan dengan menyiapkan dua kuvet, yaitu blanko berisi aquades dan sampel DNA tanaman. Satu kuvet sampel DNA diisi dengan aquades 697  $\mu\text{l}$  dan 3  $\mu\text{l}$  sampel DNA. Kuvet blanko diisi dengan aquades 700  $\mu\text{l}$ . Kemudian, kuvet blanko dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV-VIS dan diatur lambda 260 nm. Lalu, ditekan dan dicatat hasilnya. Kemudian, dikeluarkan blanko, dimasukkan kuvet sampel DNA tanaman, ditekan kembali pada lambda 260 nm, dan dicatat hasilnya. Kemudian, kuvet sampel DNA tanaman dikeluarkan dan dimasukkan kuvet blanko. Lalu, diatur ke lambda 280 nm dan dicatat hasilnya. Setelah itu, kuvet blanko dikeluarkan dan dimasukkan kuvet sampel DNA tanaman. Lalu, ditekan lagi pada lambda 280 nm dan dicatat hasilnya. Hasil yang didapatkan dihitung dengan rumus sebagai berikut untuk mengetahui kemurnian DNA tanaman dan konsentrasinya.

Kemurnian DNA

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\lambda 260 \text{ nm}}{\lambda 280 \text{ nm}}$$

Konsentrasi DNA

$$\text{Konsentrasi DNA} = \lambda 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran} \left[ \frac{700}{3} \right]$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi DNA tanaman berdasarkan elektroforesis menunjukkan muncul pita pada ulangan ke-3 dan 4 yang ukurannya setara dengan DNA marker Lambda 3  $\mu\text{l}$  (sangat tipis). Sedangkan ulangan ke-1, 2, 5, dan 6 tidak muncul pita (Figure 1a). Hasil isolasi DNA cendawan pada ulangan ke-3 muncul pita (semir) dan ukurannya setara dengan DNA marker Lambda 3  $\mu\text{l}$ . Sedangkan ulangan ke-1, 2, 4, dan 5 tidak muncul pita DNA dalam visualisasi elektroforesis, melainkan pita RNA (Figure 1b). Hasil isolasi DNA bakteri muncul pita pada sampel 1 sampai 6 dan ukurannya setara dengan DNA marker Lambda 3  $\mu\text{l}$  (Figure 1c). Kemunculan pita dalam visualisasi gel elektroforesis setara dengan DNA marker Lambda 3  $\mu\text{l}$  menunjukkan keberhasilan dalam isolasi DNA tanaman, cendawan, dan bakteri.

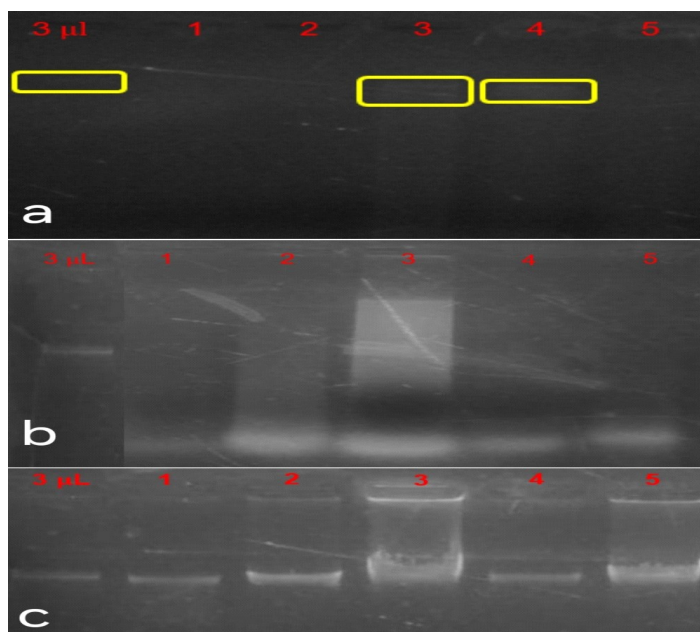


Figure 1. Visualisasi gel elektroforesis DNA eukariot (a) tanaman dan b) cendawan) dan prokariot (c) bakteri. 3  $\mu\text{l}$  : DNA marker Lambda, 1-5: ulangan sampel

Tabel 1. Spektrofotometer UV-VIS DNA eukariot dan prokariot

Tipe Organisme	Sampel	Mean $\pm$	
		Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA
Eukariot	Tanaman	1,29 $\pm$ 0,28	1417 $\pm$ 343
	Cendawan	1,90 $\pm$ 1,62	2801 $\pm$ 1631
Prokariot	Bakteri	1,38 $\pm$ 0,06	3062 $\pm$ 423

Spektrofotometer UV-VIS menunjukkan rata-rata kemurnian DNA tanaman lebih kecil daripada DNA cendawan dan bakteri. Tetapi, rata-rata DNA cendawan mendekati tingkat kemurnian antara 1,8-2,0, kecuali DNA tanaman dan bakteri. Hal ini mungkin dikarenakan masih terdapat debris atau pelarut lainnya yang terikat dan tidak tercuci habis setelah dicuci dengan etanol. Rentang kemurnian DNA tanaman yang baik diketahui antara 1,8-2,0. Rata-rata Konsentrasi DNA tanaman menunjukkan lebih rendah daripada DNA cendawan dan bakteri. Konsentrasi yang paling besar ditunjukkan pada DNA bakteri (Table 1).

Keberhasilan isolasi DNA tanaman, cendawan, dan bakteri diperoleh dengan terbentuknya pita. DNA dari sel dapat divisualisasikan melalui gel elektroforesis karena sifat DNA dan teknik yang digunakan selama proses tersebut. Sifat DNA diketahui memiliki molekul bermuatan negatif karena tulang punggung fosfatnya. Sehingga, ketika arus listrik dialirkan selama elektroforesis, molekul DNA bergerak menuju elektroda bermuatan positif. Pergerakannya tergantung dengan ukuran dan muatan fragmen DNA karena beda ukuran fragmen DNA akan menunjukkan perbedaan letak pita dalam gel elektroforesis (Lee *et al.*, 2012; Pandey dan Teixeira, 2017). Gel yang digunakan dalam elektroforesis menyediakan matriks yang memudahkan molekul DNA dapat bermigrasi. Gel agarosa biasanya digunakan dan membentuk struktur, seperti jaring yang lebih menghambat pergerakan fragmen DNA yang lebih besar daripada fragmen DNA yang lebih kecil (Badal dan Delgoda, 2017).

Fragmen DNA dalam gel elektroforesis juga diwarnai dengan perwarna flouresen. Ini berguna untuk memudahkan melihat pita yang terbentuk. Pewarnaan flouresen secara umum menggunakan etidium bromida. Karena sensitifnya tinggi, bisa deteksi DNA berukuran kecil, harga lebih murah, bisa digunakan pada gel agarosa dan poliakrilamid, tersedia secara luas, dan sering digunakan sebagai standar pewarnaan DNA (Sambrook dan Russell, 2001; Asad *et al.*, 2023). Fragmen DNA yang terikat dengan perwarna flouresen dalam elektroforesis dapat terlihat dengan jelas sebagai pita ketika diberi sinar UV. Setiap pita terdapat kesesuaian dengan ukuran fragmen DNA tertentu. Sehingga letak pita dalam gel akan berbeda-beda. Penanda berat molekul atau marka sering digunakan untuk mengetahui ukuran fragmen DNA. Ini diketahui sebagai DNA *ladder* 1 kb atau DNA marker Lambda. Biasanya dipasang di samping sampel DNA untuk membandingkan jarak migrasi fragmen DNA dengan marka (Pandey dan Teixeira, 2017).

Fragmen DNA dalam gel elektroforesis divisualisasikan tampak sebagai garis horizontal. Garis horizontal yang dikenal sebagai pita merupakan hasil pemisahan fragmen DNA berdasarkan ukurannya (Intarapanich *et al.*, 2015). Jenis DNA diketahui ada dua, yaitu DNA linier dan sirkular. Keduanya dapat dipisahkan dan divisualisasikan dalam gel elektroforesis. DNA linier merupakan DNA yang diisolasi dari inti sel eukariotik atau prokariotik biasanya linier dan tersusun dari kromosom. Sedangkan DNA sirkular dari sel prokariotik berbentuk lingkaran, seperti plasmid. DNA linier dan sirkular dapat teramati sebagai pita dalam gel elektroforesis dengan jarak migrasi yang dipengaruhi oleh ukuran dan muatannya (Magdeldin, 2012; Bendich, 2007).

Keberhasilan isolasi DNA tanaman, cendawan, dan bakteri juga karena fungsi dari reagen pada protokol isolasi DNA yang digunakan, seperti CTAB, PVP, P:C:I, C:I, NaOAc, dan etanol. CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) digunakan dalam isolasi DNA karena merupakan metode yang efisien dan banyak digunakan untuk mengekstraksi DNA dari berbagai organisme. CTAB adalah larutan kationik yang dapat mengikat DNA dan komponen seluler lainnya. Sehingga, memungkinkan terjadinya pemisahan DNA dari bahan seluler lainnya. Metode ekstraksi CTAB melibatkan penggunaan *buffer* berbasis CTAB untuk melisis sel dan melepaskan DNAny. CTAB juga secara efektif dapat menghilangkan senyawa polifenol (Carter-House *et al.*, 2020). Selain itu, metode CTAB relatif sederhana dan mudah digunakan untuk ekstraksi DNA skala besar (Carr, 2022).

PVP digunakan dalam isolasi DNA untuk meningkatkan hasil dan kualitas DNA yang diekstraksi. PVP adalah polimer non-ionik yang dapat berikatan dengan DNA dan komponen seluler lainnya, memungkinkan pemisahan DNA secara selektif dari bahan seluler lainnya. Dalam isolasi DNA, PVP sering dikombinasikan dengan CTAB untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi DNA. PVP dapat membantu menstabilkan DNA selama proses ekstraksi, mencegah fragmentasi, dan degradasi (Pilo *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2021). Selain itu, PVP juga berperan mengurangi

keberadaan senyawa polifenol dan agen penghambat lainnya yang dapat mengganggu *downstream* DNA (Umesha *et al.*, 2016).

Merkaptoetanol adalah pereduksi khusus yang digunakan dalam isolasi DNA tanaman. Karena dapat memutus ikatan disulfida protein. Sehingga, mengganggu struktur protein dan memudahkan terdenaturasi. Reagen ini juga menginaktivasi nuklease, mencegah oksidasi, dan risiko degradasi DNA (Yee *et al.*, 2018). Fenol:Kloroform:Isoamil alkohol (P:C:I) digunakan dalam isolasi DNA untuk menghilangkan lipid dan sisa-sisa komponen sel ke dalam fase organik. Sehingga, terlepas DNA dalam fase supernatan (Patrinos, 2017). Metode ini didasarkan pada prinsip pengendapan DNA dari sel, dimana DNA diendapkan dengan menambahkan fenol:kloroform:isoamil alkohol ke dalam larutan berisi sampel, diikuti dengan sentrifugasi untuk memisahkan endapan yang mengandung DNA di fase supernatan (Gautam 2022). Fenol:kloroform:isoamil alkohol dalam isolasi DNA juga dapat membantu menghilangkan kontaminan, seperti protein dan senyawa polifenol (Kim *et al.*, 2010). Kloroform:Isoamil alkohol (C:I) juga digunakan untuk menghilangkan debris selular dan kontaminan lainnya, seperti senyawa polifenol dan protein. Campuran larutan ini dapat memisahkan DNA dengan membentuk dua fase yaitu, fase supernatan bagian atas dan bening mengandung DNA. Sedangkan fase supernatan bagian bawah mengandung kontaminan dan debris selular yang sudah dilarutkan (Gautam, 2022; Greco *et al.*, 2014).

NaOAc (Sodium Asetat) dan etanol digunakan untuk presipitasi DNA yang dari fase supernatan dan menghilangkan kontaminan. NaOAc dapat membantu netralisir pH dan mencegah degradasi selama ekstraksi DNA. Etanol digunakan sebagai agen penghilang NaOAc dan presipitasi DNA. Presipitasi DNA dicuci dengan etanol 70% dan diresuspendi dengan *buffer* yang memadai untuk aplikasi *downstream* (Fredricks *et al.*, 2005; Almakarem *et al.*, 2012).

Ketidakberhasilan isolasi DNA pada tanaman dapat terjadi karena penggunaan bahan berkualitas buruk menyebabkan rendahnya hasil DNA. Sehingga, perlu dipastikan jaringan segar dan sehat digunakan untuk isolasi DNA. Metode lisis yang tidak memadai dapat mengakibatkan lisis sel yang tidak sempurna dan pelepasan DNA yang tidak memadai. Metode penggilingan atau homogenisasi yang tepat harus dipilih berdasarkan jenis jaringan tanaman. Peralatan yang terkontaminasi juga dapat mengganggu sampel DNA. Selalu gunakan bahan dan reagen yang bersih dan steril. Denaturasi protein yang tidak memadai dapat menyebabkan pengendapan bersama dengan DNA selama tahap pengendapan alkohol. Perlu dipastikan denaturasi menyeluruh dengan pelarut yang tepat. *Buffer* yang tidak tepat dapat mempengaruhi kemurnian DNA. Ikuti kondisi *buffer* sesuai protokol. Penghapusan fenol-kloroform yang tidak habis dapat menghambat ekstraksi DNA tanaman. Konsentrasi etanol atau isopropanol yang tidak tepat untuk pengendapan DNA. Pencucian pelet yang tidak tepat akan menyisakan kontaminan (Michiels *et al.*, 2003; Healey *et al.*, 2014; Abdel-Latif dan Osman, 2017; Haque *et al.*, 2004).

Faktor ketidakberhasilan isolasi DNA cendawan terjadi karena metode ekstraksi DNA yang tidak tepat melisis dinding sel cendawan. Efisiensi ekstrak DNA yang rendah karena penggunaan metode yang tidak efektif. Kesalahan prosedur selama isolasi. *Buffer* lisis yang tidak memadai dan terjadi kontaminan selama isolasi DNA cendawan. Purifikasi yang tidak tepat. Sehingga, masih meninggalkan sisa kontaminan yang dapat mempengaruhi kualitas DNA. Jumlah biomassa cendawan yang digunakan terlalu sedikit karena degradasi berdampak pada hasil ekstraksi DNA. Cendawan yang memproduksi metabolit sekunder dapat mengganggu isolasi DNA. Sehingga, diperlukan perlakuan pendahuluan dengan metode, seperti ekstraksi larutan atau perlakuan enzimatik yang dapat membantu menghilangkan senyawa metabolit sekunder (Kumar dan Mugunthan, 2018; Lever *et al.*, 2015; Goldschmidt *et al.*, 2014).

Ketidakberhasilan isolasi DNA bakteri dapat disebabkan oleh lisis sel yang tidak memadai, inhibisi ekstraksi DNA, kontaminan, degradasi DNA, biomassa bakteri yang sedikit, dan kesalahan teknik dalam isolasi DNA. Lisis sel yang tidak memadai dapat menyebabkan hasil ekstraksi DNA rendah. Inhibisi ekstraksi DNA dapat terjadi karena *buffer* yang digunakan terkontaminasi oleh senyawa tertentu. Kontaminan yang mengganggu isolasi DNA dapat berupa sisa reagen yang tidak tercuci habis dalam tahap pemurnian. Degradasi DNA karena aktivitas enzim nuklease. Biomassa bakteri yang rendah karena sampel yang digunakan terlalu sedikit. Kesalahan teknik ekstraksi DNA karena kesalahan dalam penggunaan prosedur atau protokol selama isolasi (Leuko *et al.*, 2008; Rantakokko-Jalava dan Jalava, 2002; Sophian dan Syukur, 2021).

## KESIMPULAN

Konsentrasi PVP 1% dan 2% memiliki pengaruh terhadap kualitas dan kuantitas isolasi DNA dari sel eukariot (tanaman dan cendawan) dan prokariot (bakteri). Hasil isolasi DNA menunjukkan bakteri lebih konsisten dengan kemunculan pita DNA pada semua sampel dibandingkan dengan tanaman dan cendawan. Isolasi DNA tanaman dan cendawan memerlukan optimasi lebih lanjut karena hasil yang bervariasi, menunjukkan keberhasilan yang lebih

rendah dan kemurnian DNA yang kurang optimal. Sementara itu, metode isolasi yang menggunakan PVP berhasil meningkatkan hasil dan kualitas DNA yang diisolasi dari bakteri, namun masih memerlukan penyesuaian untuk jenis sel eukariot lainnya.

## REFERENSI

- Aamir S, Sutar S, Singh SK, Baghela A. (2015). A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine*. 5(2):74–81. doi: 10.5943/ppq/5/2/6.
- Abdel-Latif A, Osman G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 13:1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4.
- Almakarem AAS, Heilman KL, Conger HL, Shtarkman YM, Rogers SO. (2012). Extraction of DNA from plant and fungus tissues in situ. *BMC Res Notes* 5:266. doi: 10.1186/1756-0500-5-266.
- Al-Samarrai TH, Schmid J. (2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*. 30(1):53–56. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00664.
- Asad N, Cregg S, Shakya S, Stegman S, Timmons L. (2023). Sustainable and cost-effective gel documentation. *Methods Protoc*. 6(2):21. doi: 10.3390/mps6020021.
- Badal S, Delgoda R. (2017). *Pharmacogenosy: fundamentals, applications and strategies*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Bendich AJ. (2007). The size and form of chromosomes are constant in the nucleus, but highly variable in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *BioEssays*. 29(5):474-483. doi: 10.1002/bies.20576.
- Boldura OM, Balta C, Awwad, NS. (2020). *Biochemical analysis tools - methods for bio-molecules studies*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Branton D, Deamer D. (2019). *Nanopore sequencing: an* PENDAHULUAN. Singapore: World Scientific.
- Carr E. (2022). *CTAB DNA extraction protocol for fungi*. University Ave, USA: Protocols.
- Carter-House D, Jason ESt, Sarah U, Tania K. (2020). *Fungal CTAB DNA extraction*. University Ave, USA: Protocols.
- Conlon BH, Schmidt S, Poulsen M, Shik JZ. (2022). Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR Protocols*. 3(1):101126. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101126.
- Francioli D, Lentendu G, Lewin S, Kolb S. (2021). DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota-Pitfalls and Solutions. *Microorganisms*. 9(2):361. doi: 10.3390/microorganisms9020361.
- Fredricks DN, Smith C, Meier A. (2005). Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 43(10):5122-5128. doi: 10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005.
- Galliano I, Daprà V, Zaniol E, Alliaudi C, Graziano E, Montanari P, Calvi C, Bergallo M. (2021). Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Pract Lab Med*. 25:e00221. doi: 10.1016/j.plabm.2021.e00221.
- Gautam A. (2022). *DNA and RNA isolation techniques for non-experts*. Berlin, Germany: Springer Nature.
- Goldschmidt P, Degorge S, Merabet L, Chaumeil C. (2014). Enzymatic treatment of specimens before dna extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PLOS ONE*. 9(6):e94886. doi: 10.1371/journal.pone.0094886.
- Greco M, Sáez CA, Brown MT, Bitonti MB. (2014). A simple and effective method for high quality co-extraction of genomic DNA and total RNA from low biomass *Ectocarpus siliculosus*, the model brown alga. *PLOS ONE*. 9(5):e96470. doi: 10.1371/journal.pone.0096470.
- Haque S, Ashraf N, Awal A, Sarker RH, Begum S, Khan H. (2004). method for quality DNA isolation from different partsof jute plant: *Corchorus capsularis* L. and *C. olitorius* L. *Plant Tissue Cult*. 14(2):143-148.
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21. doi: 10.1186/1746-4811-10-21.
- Intarapanich A, Kaewkamnerd S, Shaw PJ, Ukosakit K, Tragoonrung S. (2015). Automatic DNA diagnosis for 1D gel electrophoresis images using bio-image processing technique. *BMC Genomics*. 16(12):12-15. doi: 10.1186/1471-2164-16-S12-S15.
- Kim JS, Seo SG, Jun BK, Kim JW, Kim SH. (2010). Simple and reliable DNA extraction method for the dark pigmented fungus, *Cervospora sojae*. *Plant Pathol. J*. 26(3):289-292. doi: 10.5423/PPJ.2010.26.3.289.
- Kumar M, Mugunthan M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Med J Armed Forces India*. 74(4):333-336. doi: 10.1016/j.mjafi.2017.07.009.
- Kumar M, Mugunthan M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Med J Armed Forces India*. 74(4):333-336. doi: 10.1016/j.mjafi.2017.07.009.

- Lee BJ, Kim S, Lee JW, Lee HM, Eo SH. (2021). Technical note: Polyvinylpyrrolidone (PVP) and proteinase-K improve the efficiency of DNA extraction from Japanese larch wood and PCR success rate. *Forensic Sci Int.* 328:111005. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.111005.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* (62):3923. doi: 10.3791/3923.
- Leuko S, Goh F, Ibáñez-Peral R, Burns BP, Walter MR, Neilan BA. (2008). Lysis efficiency of standard DNA extraction methods for *Halococcus* spp. in an organic rich environment. *Extremophiles.* 12:301–308. doi: 10.1007/s00792-007-0124-8.
- Lever MA, Torti A, Eickenbusch P, Michaud AB, Šantl-Temkiv T, Jørgensen BB. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Front. Microbiol.* 6:476. doi: 10.3389/fmicb.2015.00476.
- Magdeldin S. (2012). *Gel electrophoresis - principles and basics*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Michiels A, Ende WV, Tucker M, Riet LV, Laere AV. (2003). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry.* 315(1):85-89. doi: 10.1016/S0003-2697(02)00665-6.
- Nilsson RH, Tedersoo L, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Unterseher M, Porter TM, Bengtsson-Palme J, Walker DM, de Sousa F, Gamper HA, Larsson E, Larsson KH, Kõljalg U, Edgar RC, Abarenkov K. A. (2015). Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. *Microbes Environ.* 30(2):145-150. doi: 10.1264/jsme2.ME14121.
- Pandey A, Teixeira AJC. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: foundations of biotechnology and bioengineering*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Patrinos GP. (2017). *Molecular diagnostics*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Pilo P, Tiley AMM, Lawless C, Karki SJ, Burke J, Feechan A. (2022). A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 117:101758. doi: 10.1016/j.pmpp.2021.101758.
- Rantakokko-Jalava K, Jalava J. (2002). Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol.* 40(11):4211-4217. doi: 10.1128/JCM.40.11.4211-4217.2002.
- Riffiani R, Wada T, Shimomura N, Yamaguchi T, Aimi T. (2021). An optimized method for high-quality DNA extraction medicinal fungi *Mycocleptodonoides aitchisonii* for whole genome sequencing. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* 948:012032. doi: 10.1088/1755-1315/948/1/012032.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular cloning 3rd edition*. Cold Spring Harbor, NY, United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sophian A, Syukur A. (2021). Short communication: analysis of purity and concentration of isolated DNA in making raw dna of rat species. *ERUDITIO.* 1(2):1-5. doi: 10.54384/eruditio.v1i2.75.
- Umesha S, Manukumar HM, Raghava S. (2016). A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *3 Biotech.* 6(2):123. doi: 10.1007/s13205-016-0436-4.
- Yee W, Kumar JN, Muthusamy PD. (2018). Inclusion of 2-Mercaptoethanol in lysis buffer could interfere with isolation of high molecular weight DNA from freshwater microalgae. *Indian J Microbiol.* 58(1):109-113. doi: 10.1007/s12088-017-0698-5.