

IDENTIFIKASI DAN ISOLASI DNA DAUN JERUK LEMON (*Citrus limon* (L.) *Burm. f.*)

Khumairo Magfirotus Isazava¹, Natasya Irbene Frehadini¹, Ola Christiana Sandra¹, Reflinda Sindy Puspita¹, Septiani Rahmat Suci¹, Soraya Yedija Hosyana¹, Yohanes Andi Aldana¹, Fibe Yulinda Cesa¹

¹Universitas Ma Chung Malang
fibe.yulinda@machung.ac.id

Received: 06 January 2025 – Revised: 12 February 2025 - Accepted: 28 February 2025 - Published: 20 March 2025

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi proses isolasi DNA dan protein dari daun jeruk lemon (*Citrus limon* L.), serta analisis kemurnian dan konsentrasinya. Hasil isolasi DNA dengan analisis spektrofotometri menunjukkan rasio absorbansi DNA (260/280 nm) pada dua sampel yaitu 2,6382 dan 3,03372 yang berada di luar rentang standar (1,7-1,9) sehingga mengindikasikan kontaminasi RNA. Hasil agarose gel elektroforesis menunjukkan tidak adanya pita DNA yang terlihat, meskipun menggunakan primer spesifik untuk PCR. Isolasi protein dilakukan dengan metode *salting out* menggunakan amonium sulfat, dan analisis konsentrasi menggunakan metode Bradford. Nilai absorbansi sampel diperoleh 2,0375-2,0472 yang berada di luar rentang optimal (0,2-0,8) sehingga memengaruhi akurasi perhitungan konsentrasi. Nilai konsentrasi protein rata-rata diperoleh sebesar 496,2989 ng/mcg. Absorbansi tinggi ini kemungkinan disebabkan oleh kepekatan sampel yang tidak diencerkan atau kontaminasi dari senyawa fenolik.

Kata Kunci : daun jeruk lemon, isolasi DNA, PCR, elektroforesis, purifikasi protein.

Abstract

*This study aims to evaluate the process of DNA and protein isolation from lemon leaf (*Citrus limon* L.), along with the analysis of their purity and concentration. The spectrophotometric analysis of DNA isolation results showed absorbance ratios (260/280 nm) of 2.6382 and 3.03372 for two samples, exceeding the standard range (1.7–1.9), indicating RNA contamination. Agarose gel electrophoresis results revealed no visible DNA bands, despite the use of specific primers for PCR. Protein isolation was conducted using the salting-out method with ammonium sulfate, and concentration analysis was performed using the Bradford method. The absorbance values of the samples ranged from 2.0375 to 2.0472, exceeding the optimal range (0.2–0.8), which affected the accuracy of the concentration calculations. The average protein concentration was 496.2989 ng/mcg. The high absorbance values were likely due to undiluted sample concentrations or contamination from phenolic compounds.*

Keywords: lemon leaves, DNA isolation, PCR, electrophoresis, protein purification.

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu kondisi di mana beberapa sel dalam tubuh tumbuh tak terkendali dan menyebar ke bagian tubuh lainnya. Kanker dapat bermula di mana saja dalam triliunan sel yang membentuk tubuh manusia (Steck & Murphy, 2020). Di antara kanker yang menjadi isu global, kanker payudara merupakan kanker yang paling umum di dunia (Ferlay et al., 2020). Kanker payudara merupakan kondisi yang sering terjadi di kalangan wanita berusia empat puluhan dan lima puluhan. Memiliki tingkat kematian 20% dan tingkat kesakitan 30% (Petroni et al., 2021). Selain itu, tingkat kejadian kanker meningkat setiap hari karena ketidakstabilan fisiologis manusia yang berkembang dan kebiasaan makan gizi saat ini, menstruasi prematur dan menopause yang tertunda, misalnya, meningkatkan risiko kanker payudara (Yuan et al., 2021). Kanker payudara menempati urutan pertama jumlah kasus kanker sekaligus menjadi penyebab kematian terbesar akibat kanker di dunia setiap tahunnya.

Menurut (WHO, 2022) prevalensi kanker payudara sekitar 2,3 juta kasus dimana kanker ini paling banyak diderita oleh kaum wanita. Sekitar 99% kanker payudara terjadi pada wanita dan 0,5–1% kanker payudara terjadi pada pria. Hingga tahun tersebut telah tercatat kematian yang disebabkan oleh kanker payudara sebesar 670.000 kematian di seluruh dunia. Insiden penyakit ini diperkirakan semakin tinggi di seluruh dunia. Sedangkan menurut (Sung et al., 2021) diketahui bahwa kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan persentase kasus baru tertinggi, yaitu sebesar 11%, dan persentase kematian akibat kanker payudara sebesar 6,9%. Di Indonesia kanker payudara merupakan kanker dengan insiden tertinggi nomor dua setelah kanker serviks dan terdapat kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan jumlah kanker payudara di Indonesia didapatkan kurang lebih 65.858 kasus baru setiap tahun (273.523.621 populasi) (Herawati et al., 2021).

Flavonoid merupakan senyawa polifenol alami yang dihasilkan oleh tumbuhan dan berperan sebagai metabolit sekunder bioaktif (Kopustinskiene et al., 2020). Flavonoid merupakan salah satu antioksidan yang terkandung dalam daun jeruk lemon. Sebagai antioksidan yang kuat, flavonoid melindungi tumbuhan dari stres lingkungan dan telah banyak diteliti karena manfaatnya bagi kesehatan manusia (Nabavi et al., 2018). Dalam beberapa dekade terakhir, banyak penelitian telah dilakukan untuk memahami potensi flavonoid sebagai senyawa anti-kanker. Penelitian awal menunjukkan bahwa flavonoid dapat menunjukkan aktivitas anti-kanker yang menjanjikan melalui berbagai mekanisme aksi (Jenie, et al., 2019). Walaupun mekanisme pastinya belum sepenuhnya dipahami, flavonoid dapat melawan berbagai karakteristik kanker, seperti gangguan metabolisme, stres oksidatif, peradangan kronis, dan pembentukan metastasis, dengan memengaruhi fungsi mitokondria dan pengaturan energi dalam sel (Neagu et al., 2019). Flavonoid juga mampu melindungi sel-sel normal dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas, yang dapat menyebabkan kerusakan DNA dan memicu perkembangan kanker. Aktivitas antioksidan flavonoid juga dapat memberikan perlindungan terhadap efek samping dari terapi kanker yang agresif, seperti radioterapi dan kemoterapi (Feng, et al., 2016; Zhou, et al., 2019).

Jeruk lemon (*Citrus limon (L.) Burm. f.*) adalah salah satu tanaman yang memiliki beragam manfaat kesehatan dan telah lama digunakan sebagai bahan obat tradisional di berbagai belahan dunia. Meski bukan tanaman asli Indonesia, jeruk lemon telah dikenal sejak abad ke-17 di Eropa sebagai solusi alami untuk mencegah kekurangan vitamin C pada pelaut (Marwanto, 2014). Secara genetik, lemon merupakan hibrida yang kompleks, hasil persilangan antara jeruk asam (*Citrus aurantium*) dan citron (*Citrus medica*), dengan kontribusi genom masing-masing dari citron (50%), pummelo (31%), dan mandarin (19%). Pada buah jeruk lemon dikategorikan sebagai sumber penting senyawa fenol dan glikosida. Senyawa pada tanaman ini mengandung asam fenolik, bioaktif yang bertanggung jawab untuk antioksidan. Selain itu, didalam daun jeruk lemon terdapat senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan meliputi senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan steroid (Harahap et al., 2021).

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah mortal dan alu, Mikropipet 20 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl, tip, water bath, eppendorf 2 ml, vortex, sentrifuge, spektrofotometer UV-Vis, PCR (Thermal Cycler), apparatus agarose gel elektroforesis. Mortar dan alu. Tabung eppendorf 12 pcs, setrifus dingin, es batu, termos, baki, mikropipet, *white tip*, *blue tip*, *yellow tip*, spektrofotometer dan kuvet

Bahan yang digunakan adalah daun jeruk lemon segar, buffer ekstraksi (Tris-HCl pH 8 200 mM, EDTA pH 8 25 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.5%), 2 × CTAB (Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA pH 8 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 2% w/v, PVP 1% w/v), Buffer TE (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8 1 mM,

Kloroform:Isoamyl alcohol (24:1), Isopropanol, Etanol 70%, agarose, DNA template, primer forward & reverse, premix PCR, nuclease free water, Buffer TBE (Tris-Boric acid-EDTA), EtBr. Daun tomat, nitrogen cair, 10% PVP, buffer ekstraksi (50mM Buffer fosfat; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl), amonium sulfat, reagen Bradford, water for Injection (WFI), metanol, dan bovine serum albumin (BSA).

Isolasi DNA Kulit Daun Jeruk

Protokol dimulai dengan memanaskan buffer ekstraksi pada suhu 60°C. Sebanyak 800 mg daun jeruk segar dipotong-potong kecil dengan ukuran sekitar 0,5 cm, kemudian dimasukkan ke dalam mortar. Ke dalam mortar tersebut ditambahkan 600 µl buffer ekstraksi dan daun digerus hingga halus. Selanjutnya, tambahkan 1200 µl buffer ekstraksi dan gerus kembali hingga benar-benar halus. Seluruh gerusan daun beserta cairannya dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 2 ml. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan 400 µl 2× CTAB, kemudian divorteks selama minimal 1 menit. Campuran kemudian di-spindown pada kecepatan 8.400 × g selama 10 menit. Supernatant dipindahkan ke tabung Eppendorf 2 ml baru dan ditambahkan kloroform:isoamyl alcohol dengan perbandingan 24:1 sebanyak volume yang sama.

Campuran divorteks minimal 1 menit, lalu di-spindown pada 8.400 × g selama 10 menit. Fase atas dipindahkan ke tabung Eppendorf 2 ml baru dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama. Tabung dibolak-balik (inverting) sebanyak 15 kali, kemudian di-spindown pada 8.400 × g selama 10 menit. Pellet yang terbentuk diamati dengan hati-hati, dan cairan dituang tanpa mengganggu pellet. Tambahkan etanol 70% sebanyak 1 ml, kemudian inversi tabung beberapa kali dan spindown pada 8.400 × g selama 5 menit. Langkah pencucian dengan etanol 70% diulangi minimal 2 kali, lalu pellet dikeringkan dengan metode air-dry selama minimal 25 menit. Terakhir, pellet disuspensikan dengan penambahan 80 µl buffer TE. DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C untuk penggunaan selanjutnya.

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA

Prosedur pengukuran DNA menggunakan spektrofotometer diawali dengan menghidupkan alat. Dua kuvet quartz diisi dengan 500 µl buffer, kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk pembacaan baseline dan blanko pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Setelah itu, kuvet sampel dikeluarkan, dibilas dengan etanol dan aseton, lalu dikeringkan. Selanjutnya, ke dalam kuvet ditambahkan 495 µl buffer TE dan 5 µl DNA, kemudian ditutup dan dibolak-balik beberapa kali untuk mencampur. Kuvet sampel dimasukkan kembali ke dalam spektrofotometer untuk pembacaan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Terakhir, dilakukan perhitungan konsentrasi dan kemurnian DNA berdasarkan hasil pengukuran.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Protokol PCR dimulai dengan mempersiapkan campuran reaksi dalam tabung PCR yang terdiri dari premix 4 µl, DNA template 50-100 ng (2 µl), primer forward 10 µM (1 µl), primer reverse 10 µM (1 µl), dan air bebas nuklease hingga volume total 12 µl. Setelah komponen dicampurkan, tabung divorteks singkat selama 1 detik dan di-spindown sebentar. Proses PCR kemudian dijalankan dengan siklus awal denaturasi pada 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada 55°C selama 45 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 45 detik. Tahap akhir adalah ekstensi akhir pada 72°C selama 15 menit untuk memastikan seluruh fragmen DNA teramplifikasi dengan sempurna.

Agarose Gel Elektroforesis

Protokol elektroforesis dimulai dengan membuat gel agarose dengan melarutkan 0,75 g agarose dalam 75 ml buffer TBE menggunakan microwave hingga sepenuhnya larut. Setelah sedikit mendingin, tambahkan etidium bromida dengan pengenceran 1/10.000 dan tuang ke dalam gel tray untuk memadat. Setelah gel memadat, pindahkan ke dalam bak elektroforesis. Selanjutnya, sebanyak 15 µl campuran PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose. Proses elektroforesis dijalankan selama 1 jam untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya. Terakhir, gel diamati di bawah sinar UV, dengan primer TAA15 diketahui mengamplifikasi DNA tanaman citrus pada ukuran basa spesifik yaitu 150, 167, 183, 192, 200, 229, 325, 350, 500, 700, dan 800 pasangan basa.

Isolasi, Purifikasi, dan Penetapan Konsentrasi Protein

Proses isolasi dilakukan pada suhu 4°C. Siapkan 4-5 lembar daun jeruk lemon, bungkus dengan aluminium foil, lalu masukkan ke dalam termos berisi nitrogen cair. Letakkan mortar dan pestle di atas es, haluskan daun yang didinginkan dengan menambahkan nitrogen cair sedikit demi sedikit hingga menjadi serbuk. Tambahkan 10% PVP dan buffer ekstraksi (perbandingan 1:3) sebanyak 2-3 mL, lalu homogenkan hingga cairan berwarna hijau terbentuk. Pindahkan cairan ke tabung eppendorf, kemudian sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit dalam kondisi dingin. Ambil supernatan sebagai sampel A dan simpan pellet sebagai sampel B untuk uji protein lebih lanjut. Purifikasi Protein Menggunakan Teknik Salting Out yang dimana purifikasi protein dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) pada supernatan hasil isolasi protein. Penambahan dilakukan dengan perbandingan 1:1 terhadap volume supernatan. Campuran ini kemudian didiamkan selama 15 menit hingga terbentuk endapan. Endapan yang terbentuk dipisahkan dan disimpan dalam tabung eppendorf baru sebagai sampel C, sedangkan bagian cair yang tidak mengendap

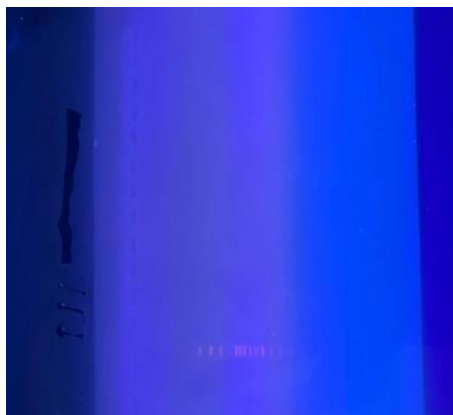
disimpan sebagai sampel D untuk analisis lebih lanjut. Penetapan Konsentrasi Protein Menggunakan Metode Bradford (Modifikasi) yaitu penetapan dimulai dengan pembuatan kurva standar menggunakan larutan BSA 1 mg/mL dan WFI. Campuran larutan ini dipipet ke dalam tujuh tabung eppendorf hingga total volume 100 μ L per tabung. Selanjutnya, tambahkan 1,5 mL reagen Bradford, tutup tabung dengan aluminium foil, dan diamkan selama 10 menit. Setelah inkubasi, ukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm atau 615 nm menggunakan spektrofotometer, dengan WFI sebagai blanko. Pastikan kuvet dibilas dengan methanol sebelum pengukuran. Lakukan pengukuran tiga kali untuk setiap konsentrasi dan catat hasil rata-rata absorbansi. Plot kurva standar dengan sumbu x sebagai konsentrasi dan sumbu y sebagai absorbansi rata-rata.

HASIL

Uji kuantitatif DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk menentukan konsentrasi dan kemurnian. Metode ini mengukur absorbansi pada rentang 0.1-1.0, dengan panjang gelombang 260 nm yang digunakan karena basa nitrogen DNA mencapai absorbansi maksimal, dimana satu unit absorbansi setara dengan 50 μ g/ml DNA. Rasio absorbansi 260/280 nm menjadi indikator kemurnian DNA, dengan DNA murni memiliki rasio antara 1.7-1.9. Nilai di bawah rentang ini menandakan kontaminasi protein, sedangkan nilai di atas rentang dapat mengindikasikan kontaminasi RNA atau degradasi DNA. Hasil penelitian menunjukkan hasil DNA daun jeruk lemon yang tidak murni, karena hasil kemurnian DNA pada sampel 1 = 2,6382 dan hasil kemurnian DNA pada sampel 2 = 3,03372. Analisis spektrofotometri pada sampel DNA daun jeruk lemon menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan profil DNA murni (Nath et al., 2022).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Kemurnian DNA:

Sampel 1	Sampel 2
<ul style="list-style-type: none"> • Absorbansi λ260 = 0,410314 • Absorbansi λ280 = 0,155527 • Rasio λ260/280 = 2,6382 	<ul style="list-style-type: none"> • Absorbansi λ260 = 0,195965 • Absorbansi λ280 = 0,0645954 • Rasio λ260/280 = 3,03372



Hasil penelitian
Tidak terlihat pita pada gel tray

Gambar 1. Hasil Elektroforesis

Tabel 2. Hasil Penentuan Konsentrasi Protein

Nilai Absorbansi	Nilai Konsentrasi Protein
<ul style="list-style-type: none"> • Sampel 1 = 2.0375 • Sampel 2 = 2,0379 • Sampel 3 = 2,0472 	<ul style="list-style-type: none"> • Sampel 1 : 495,1379 ng/mcg • Sampel 2 : 495,2795 ng/mcg • Sampel 3 : 498,4828 ng/mcg • Rata-rata : 496,2989 ng/mcg



Gambar 2. Kurva konsentrasi protein vs absorbansi sampel

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan memahami proses isolasi DNA dari daun jeruk lemon (*Citrus limon L.*) serta pengukuran kemurnian dan konsentrasinya. Prinsip isolasi melibatkan penghancuran dinding sel, membran, dan inti untuk melepaskan DNA, diikuti pengendapan dan pembersihan dari kontaminan seperti protein, polisakarida, dan lipid (Ahmed & Ibrahim, 2020). Nitrogen cair ditambahkan sebelum ekstraksi untuk mencegah degradasi DNA dengan menghentikan aktivitas DNase dan membekukan jaringan secara instan (Nath et al., 2022). Proses ini memudahkan penghancuran dinding sel yang rapuh akibat pembekuan dan meningkatkan akses buffer ke DNA (Nath et al., 2022). Dengan langkah ini, efisiensi ekstraksi DNA dari jaringan tanaman yang kaya selulosa dapat ditingkatkan (Ahmed & Ibrahim, 2020; Nath et al., 2022). Proses penyiapan buffer ekstraksi (Tris HCl 200 mM, EDTA 25 mM, NaCl 200 mM, SDS 0,5%) dilakukan dengan pemanasan pada suhu 60°C untuk meningkatkan efektivitas buffer. Pemanasan membantu melarutkan dan mengaktifkan SDS, yang mempermudah penghancuran membran sel serta pelepasan DNA atau RNA. Suhu ini juga mendukung penguraian membran lipid dan organel, seperti inti dan mitokondria, serta mengurangi aktivitas enzim perusak, seperti RNase, yang dapat mendegradasi RNA. Kondisi ini sangat penting terutama untuk jaringan tumbuhan dengan membran tebal, memastikan kualitas DNA atau RNA yang lebih baik (Nath et al., 2022).

Penambahan campuran kloroform:isoamyl alkohol (24:1) pada supernatan bertujuan memurnikan DNA dengan menghilangkan protein dan kontaminan lainnya. Kloroform akan mengendapkan protein dan lipid, sedangkan isoamyl alkohol akan menstabilkan campuran dan mencegah pembentukan buih yang mengganggu. Sentrifugasi yang dilakukan selama 10 menit untuk memisahkan fase organik (lapisan bawah) yang mengandung kontaminan dan fase air (lapisan atas) yang mengandung DNA murni, yang kemudian diambil untuk proses lebih lanjut dan menghasilkan DNA dengan kemurnian tinggi (Park et al., 2018). Dilanjutkan dengan penambahan isopropanol pada fase air yang bertujuan untuk mengendapkan DNA (Triani, 2020). Pencucian DNA dengan menambahkan etanol 70% ke pelet DNA adalah langkah penting untuk membersihkan DNA dari kontaminan. Supernatan yang berisi kontaminan dibuang, meninggalkan pelet DNA yang bersih sehingga meningkatkan kualitas DNA (Triani, 2020). Pengeringan pelet DNA dalam Laminar Air Flow (LAF) selama 25 menit dilakukan untuk menguapkan sisa etanol setelah pencucian, sehingga tidak mengganggu kualitas atau konsentrasi DNA saat dilarutkan kembali (Triani, 2020). Setelah pengeringan, pelet DNA ditambahkan buffer TE (Tris HCl-EDTA) untuk melindungi integritasnya (Nath et al., 2022). DNA disimpan dalam larutan pada suhu -20°C untuk mencegah kerusakan fisik dan degradasi oleh enzim DNase, karena suhu rendah memperlambat aktivitas biokimia (Nath et al., 2022).

Uji kuantitatif DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk menentukan konsentrasi dan kemurnian. Metode ini mengukur absorbansi pada rentang 0.1-1.0, dengan panjang gelombang 260 nm yang digunakan karena basa nitrogen DNA mencapai absorbansi maksimal, dimana satu unit absorbansi setara dengan 50 µg/ml DNA. Rasio absorbansi 260/280 nm menjadi indikator kemurnian DNA, dengan DNA murni memiliki rasio antara 1.7-1.9. Nilai di bawah rentang ini menandakan kontaminasi protein, sedangkan nilai di atas rentang dapat mengindikasikan kontaminasi RNA atau degradasi DNA. Hasil penelitian menunjukkan hasil DNA daun jeruk lemon yang tidak murni, karena hasil kemurnian DNA pada sampel 1 = 2,6382 dan hasil kemurnian DNA pada sampel 2 = 3,03372. Analisis spektrofotometri pada sampel DNA daun jeruk lemon menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan profil DNA murni (Nath et al., 2022).

Pada sampel 1, nilai absorbansi pada $\lambda 260$ adalah 0,410314 dan pada $\lambda 280$ adalah 0,155527, menghasilkan rasio 2,6382. Sedangkan pada sampel 2, absorbansi di $\lambda 260$ adalah 0,195965 dan di $\lambda 280$ adalah 0,0645954, menghasilkan rasio

3,03372. Kedua rasio ini jauh melebihi rentang standar untuk DNA murni (1,7-1,9), menunjukkan bahwa proses pemurnian DNA, terutama tahap penghilangan RNA, belum berjalan dengan baik. Nilai DNA yang tidak murni ini (2,6382 dan 3,03372 > 1.9) mengindikasikan kemungkinan adanya kontaminasi RNA dan/atau degradasi DNA. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan hal ini yaitu ketidaksempurnaan dalam proses pemisahan RNA selama ekstraksi, dimana RNA ikut terekstrak bersama DNA. Faktor lain meliputi proses penanganan sampel yang kurang tepat seperti pengambilan supernatan yang tidak tepat sehingga kontaminan RNA ikut terambil, selain itu pada saat pengambilan fase air yang terlalu dekat dengan interfase selama pemisahan dengan kloroform dapat menyebabkan RNA ikut terbawa, dimana fase organiknya sempat ikut terbawa dan membuat fase air bercampur sedikit dengan fase organik, sehingga larutan DNA mungkin terkontaminasi. Kondisi penyimpanan yang kurang tepat sebelum proses ekstraksi yang dapat menyebabkan degradasi parsial asam nukleat dan mempengaruhi rasio absorbansi (Retnaningati, 2020).

Proses berikutnya melibatkan proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang merupakan metode untuk menyalin dan memperbanyak DNA secara *in vitro* melalui serangkaian siklus tertentu. Proses PCR menggunakan *Thermal cycler* yang merupakan alat pengontrol suhu dengan presisi untuk mendukung 3 tahap utama PCR, yaitu denaturasi (94-98°C) di mana DNA untai ganda dipisahkan menjadi untai tunggal, annealing (45-60°C) di mana primer berikatan dengan DNA target, dan elongasi (68-72°C) di mana DNA polimerase mensintesis untai DNA baru dengan menambahkan nukleotida ke ujung primer. Siklus ini diulang sebanyak 30 kali, menghasilkan peningkatan eksponensial dari jumlah DNA target. Proses PCR diakhiri dengan tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C untuk memastikan semua produk DNA telah diamplifikasi dengan baik. Komponen DNA terdiri dari template DNA, dNTP, primer *forward*, primer *reverse*, taq polimerase dan buffer (Pertiwi, 2015).

DNA *template* adalah molekul DNA awal yang akan digandakan sebagai cetakan untuk replikasi DNA selama PCR, dan DNA ini adalah cetakan untuk sintesis DNA baru. Primer adalah fragmen DNA pendek yang dirancang khusus untuk menempel pada urutan tertentu pada *template* DNA. Fungsi primer *forward* adalah untuk memberi polimer enzimes titik awal untuk memulai sintesis DNA, dan primer *reverse* digunakan untuk mengikat ke ujung 5' untai template DNA, menentukan awal amplifikasi maju. Untuk menentukan akhir amplifikasi pada arah mundur, primer mengikat terbalik hingga ke ujung 3' membuka template DNA. dNTP atau deoksi nukleotida trifosfat, merupakan bahan baku sintesis DNA yang terdiri dari empat jenis nukleotida : dATP, TTP, dCTP, dan 2GTP. Taq polimerase, enzim DNA polimerase tahan panas yang berasal dari bakteri *Thermus Aquaticus*, menggunakan komponen inti untuk membuat untai DNA baru berdasarkan cetakan DNA *template*. Selain itu, terdapat buffer PCR sebagai larutan penyangga yang mengandung ion-ion esensial (Mg²⁺) untuk menciptakan kondisi terbaik untuk aktivitas Taq Polimerase (Kumar & Bansal, 2014).

Prinsip agarose gel elektroforesis yaitu ketika arus listrik diterapkan, DNA bermuatan negatif bergerak menuju elektroda positif melalui gel. Fragmen DNA yang lebih kecil bergerak lebih cepat karena dapat melewati pori-pori gel dengan lebih mudah, sementara fragmen yang lebih besar bergerak lebih lambat. Variabel seperti konsentrasi gel, ukuran DNA, dan tegangan listrik memengaruhi kecepatan migrasi DNA. Untuk visualisasi, gel diwarnai dengan EtBr (Etidium Bromide) yang berfungsi sebagai pewarna interkalasi DNA yang memungkinkan fragmen DNA dilihat di bawah sinar UV. Agarosa merupakan polisakarida alami, digunakan sebagai matriks gel untuk membedakan fragmen DNA berdasarkan ukuran melalui elektroforesis (Kumar & Bansal, 2014). Selain itu terdapat *marker* DNA yang merupakan sepotong DNA dengan ukuran yang sudah diketahui dengan pasti, yang berfungsi sebagai acuan untuk menentukan ukuran DNA hasil penggandaan. Saat melakukan elektroforesis, *marker* ini digunakan untuk menandai letak pasangan basa pada DNA yang bergerak ketika dijalankan bersamaan dengan sampel DNA. Pola tersebut kemudian dibandingkan dengan fragmen DNA sampel untuk mengukur panjangnya, biasanya diungkapkan dalam pasangan basa (bp). *Marker* DNA digunakan karena fragmen DNA yang diamati umumnya memiliki rentang ukuran antara 110 hingga 20.000 bp (Chen et al., 2019).

Secara teori, letak DNA dari daun jeruk lemon pada gel elektroforesis agarosa akan tergantung pada ukuran fragmen DNA yang dihasilkan selama proses isolasi. Jika isolasi menghasilkan DNA genom utuh, maka DNA tersebut akan terlihat sebagai pita di bagian bawah gel, karena DNA genom memiliki ukuran yang besar dan pergerakannya lambat. Namun, jika DNA telah mengalami fragmentasi, misalnya melalui penggunaan enzim restriksi atau PCR, posisi pita akan tergantung pada ukuran fragmen yang dihasilkan. Fragmen DNA yang lebih kecil (100-1000 bp) akan bergerak lebih jauh ke arah bawah gel dibandingkan dengan fragmen yang lebih besar. Untuk mengidentifikasi posisi pita DNA sampel dibandingkan dengan DNA *ladder*, ukuran fragmen DNA dari daun jeruk lemon dapat ditentukan. Biasanya, gel agarosa dengan konsentrasi 1-2% digunakan untuk memisahkan DNA berukuran 100-3000 bp, sedangkan untuk fragmen yang lebih besar, konsentrasi gel yang lebih rendah (0.7-1%) lebih sesuai (Chen et al., 2019).

Hasil penelitian tidak menunjukkan adanya pita DNA yang terlihat, sehingga hasilnya tidak sesuai dengan teori yang ada. Primer TAAIS seharusnya mengamplifikasi fragmen DNA dengan ukuran 167, 183, 192, 200, 229, 325, 350, 500, 700, dan 800 basis dari jeruk lemon, dengan deteksi pada ukuran 49 bp. Hasil elektroforesis pada gel agarosa yang menunjukkan pita DNA kurang jelas atau tidak terlihat mengakibatkan tidak dapatnya mengukur ukuran fragmen DNA. Hanya DNA ladder yang terlihat, karena ladder tersebut mengandung fragmen DNA dengan ukuran dan konsentrasi yang

dioptimalkan untuk divisualisasikan dengan jelas di gel. Beberapa faktor yang mungkin menyebabkan ketidakberhasilan ini, antara lain proses isolasi DNA yang tidak dilakukan dengan benar, kegagalan pada tahap PCR, keterbatasan fasilitas, atau adanya kontaminasi pada sampel DNA, penggunaan DNA template yang tidak murni, kurangnya ketelitian pada prosedur, atau hancurnya DNA selama isolasi (Gao et al., 2018).

Dalam proses isolasi protein dari daun jeruk lemon, beberapa komponen penting ditambahkan untuk mengoptimalkan hasil dan kualitas protein yang diperoleh. Penambahan 10% PVP (Polyvinylpyrrolidone) berperan penting dalam mengikat dan menghilangkan senyawa fenolik yang dapat mengganggu proses isolasi dengan membentuk kompleks yang stabil, mencegah terjadinya pengendapan atau denaturasi protein. Buffer ekstraksi untuk mempertahankan pH optimal dan untuk melindungi protein dari degradasi (Triani, 2020). Dalam proses purifikasi protein dilakukan dengan menggunakan metode *Salting Out*. Metode *salting out* memiliki prinsip dengan memanfaatkan penurunan kelarutan protein dalam air melalui penambahan garam konsentrasi tinggi. Prinsip ini bekerja dengan mengurangi hidrasi protein sehingga protein mengendap dari larutan, menjadikannya metode yang efektif untuk pemisahan protein dalam larutan kompleks. Garam yang digunakan yaitu amonium sulfat ((NH₂)₂SO₄) dengan perbandingan 1:1 yang memfasilitasi proses salting out melalui peningkatan kekuatan ionik larutan, yang mengakibatkan protein target dapat dipisahkan tanpa kehilangan aktivitas atau mengalami kerusakan struktural (Oktaviana et al., 2023).

Dalam proses penentuan konsentrasi protein, menggunakan metode Bradford yang memanfaatkan reaksi antara pewarna tersebut dengan residu asam amino bermuatan negatif, di mana perubahan warna ini diukur pada panjang gelombang 595 nm karena pada panjang gelombang ini terbentuk kompleks protein-pewarna yang menunjukkan puncak serapan maksimum pada titik tersebut. Reagen Bradford mengandung pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250 yang harus digunakan dalam kondisi gelap untuk menghindari degradasi atau perubahan kimia akibat paparan cahaya. Pewarna ini mengalami perubahan warna dari merah kecokelatan menjadi biru saat berikatan dengan protein, yang memungkinkan pengukuran konsentrasi protein secara kuantitatif (Triani, 2020). Bovine Serum Albumin (BSA) berperan penting sebagai standar protein dalam pengukuran konsentrasi protein secara kuantitatif, khususnya dalam metode Bradford, karena sifatnya yang stabil dan konsisten dalam memberikan respon warna dengan reagen tertentu. Sementara itu, terdapat *Water For Injection* (WFI) digunakan sebagai pelarut murni bebas kontaminan yang sangat penting untuk melarutkan berbagai bahan seperti protein, garam, atau buffer, serta untuk mencuci endapan protein selama proses purifikasi, sehingga menjamin kualitas hasil isolasi yang optimal (Balkani et al., 2016).

Dari hasil penelitian diperoleh persamaan kurva baku yaitu $y = 0,0089x + 0,6016$ dengan nilai $R^2 = 0,9489$ yang menunjukkan linearitas cukup baik karena nilai R mendekati nilai 1, meskipun nilai ideal R^2 untuk kurva standar protein adalah $>0,98$. Nilai absorbansi sampel diperoleh ($S_1=2,0375$; $S_2=2,0379$; $S_3=2,0472$) yang berada di luar rentang absorbansi optimal pada umumnya yaitu antara 0,2-0,8. Nilai absorbansi yang terlalu tinggi ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein dalam sampel terlalu pekat dan berada di luar rentang linear kurva standar, sehingga akan mempengaruhi ketidakakuratan perhitungan konsentrasi protein. Hasil perhitungan konsentrasi diperoleh ($S_1=495,1379$ ng/mcg ; $S_2=495,2759$ ng/mcg ; $S_3=498,4828$ ng/mcg) dengan rata-rata sebesar 496,2989 ng/mcg. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein dalam sampel daun jeruk lemon cukup tinggi. Nilai konsentrasi yang cukup tinggi ini mungkin dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu absorbansi sampel yang terlalu tinggi, adanya intervensi dari senyawa fenolik atau metabolit sekunder dari daun jeruk, kemungkinan terjadinya degradasi reagen bradford dan tidak dilakukan pengenceran sampel untuk menurunkan tingkat kepekatan sampel (Ahmed & Khumar, 2019).

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini berhasil melakukan isolasi DNA dan protein dari daun jeruk lemon (*Citrus limon L.*), meskipun hasil yang diperoleh belum optimal. Proses isolasi DNA menghasilkan rasio kemurnian yang di luar rentang ideal (1,7-1,9), yaitu yaitu 2,6382 dan 3,03372 yang menunjukkan adanya kontaminasi RNA atau degradasi DNA. Ketidakberhasilan juga ditemukan pada hasil elektroforesis, di mana pita DNA tidak terlihat, yang kemungkinan disebabkan oleh ketidaksempurnaan dalam prosedur isolasi, PCR, atau adanya kontaminasi. Isolasi protein menggunakan metode *salting out* menghasilkan konsentrasi protein yang tinggi dengan rata-rata konsentrasi sebesar 496,2989 ng/mcg. Faktor yang dapat menyebabkan hal ini seperti adanya senyawa fenolik, metabolit sekunder, atau kurangnya pengontrolan kualitas reagen. Saran untuk penelitian ini yaitu untuk mengoptimalkan prosedur isolasi DNA, lakukan langkah tambahan seperti penambahan Rnase untuk menghilangkan RNA yang masih ada dalam sampel dan tingkatkan ketelitian dalam proses pemisahan fase menggunakan kloroform untuk meminimalkan kontaminasi. Pada validasi hasil PCR, disarankan untuk menggunakan primer dengan efisiensi tinggi yang dirancang secara spesifik untuk target DNA dan pastikan DNA template memiliki tingkat kemurnian dan konsentrasi yang sesuai sebelum dilakukan amplifikasi. Dalam pengujian protein, lakukan pengenceran sampel sebelum pengukuran konsentrasi guna memastikan nilai absorbansi berada dalam rentang linearitas metode Bradford dan pastikan pula reagen seperti Bradford dan BSA disimpan dalam kondisi optimal agar tidak mengalami degradasi. Untuk meningkatkan metodologi penelitian, gunakan protokol khusus yang sesuai dengan karakteristik jaringan tumbuhan kaya fenol sehingga kualitas isolasi dapat ditingkatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S., & Ibrahim, M. (2020). Optimization of DNA Extraction Protocol from Citrus Leaves: A Comprehensive Study on the Effects of Sample Preparation. *Plant Molecular Biology Reports*, 38(2), 245-257.
- Ahmed, M., & Kumar, S. (2019). Critical factors affecting protein quantification in plant samples. *Plant Method*, 15(4), 123-135.
- Balkani, S., Shameki, S., Raoufinia, R., Parvan, R., & Abdollahzaden, J. (2016). Purification and Characterization of Bovine Serum Albumin Using Chromatographic Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*.
- Chen, J., Wang, N., Zhang, X., Tan, H., & Liu, J. (2019). Development of Chloroplast Genomic Resources for Population Genetics and Phylogenetic Studies of Citrus. *Frontiers in Genetics*, 10, 1307.
- Feng, X., Weng, D., Zhou, F., Owen, Y. D., Qin, H., Zhao, J., WenYu, Huang, Y., Chen, J., Fu, H., Yang, N., Chen, D., Li, J., Tan, R., & Shen, P. (2016). Activation of PPAR γ by a natural flavonoid modulator, apigenin ameliorates obesity-related inflammation via regulation of macrophage polarization. *EBioMedicine*, 9, 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.014>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Pineros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149, 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Gao, X., Xu, M., & Zhang, Y. (2018). Optimization of DNA Replication by Agarose Gel Electrophoresis. *Analytical Biotechnology*, 14(4), 213-220.
- Harahap, I. S., Halimatussakhidiah, H., & Amna, U. (2021). Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Lemon (Citrus Limon L.) Dari Kota Langsa, Aceh. *Quimica: Jurnal Kimia Sains Dan Terapan*, 3(1), 19–23.
- Herawati, A., Rijal, S., Aarsal, A. S. F., Purnamasari, R., & Wahid, D. A. (2021). Karakteristik Kanker Panyudara. *Fakumi Medical Journal*, 1(1). <https://doi.org/10.22146/fmj.v1i1.69879>
- Jenie, R. I., Amalina, N. D., Ilmawati, G. P. N., Utomo, R. Y., Ikawati, M., Khumaira, A., Kato, J. Y., & Meiyanto, E. (2019). Cell cycle modulation of CHO-K1 cells under genistein treatment correlates with cell senescence, apoptosis, and ROS level but in a dose-dependent manner. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9, 401–407. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.048>
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2018). *Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Kumar, P., & Bansal, A. (2014). Advances in PCR Technology: From Basic to Application. *Biotechnological Research and Innovation*, 2(4), 15-23.
- Marwanto. (2014). Manfaat dan Khasiat Jeruk Lemon. *Jurnal Kebidanan Midwifery*, 4(1), 36. <https://doi.org/10.21070/mid.v4i1.1844>
- Nabavi, S. M., Samec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Sunter, I., Rastrelli, L., Daglia, M., Xiao, J., & others. (2018). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.005>
- Nath, O., Fletcher, S. J., Hayward, A., Shaw, Henry, R. J., & Mitter, N. (2022). A Comprehensive High Quality DNA and RNA Extraction Protocol for a Range of Cultivars and Tissue Types of the Woody Crop Avocado Protiers in *Plant Science*, 13, 883812.
- Neagu, M., Constantin, C., Popescu, I. D., Zipeto, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Fenga, C., Stratakis, C. A., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. M. (2019). Inflammation and Metabolism in Cancer Cell—Mitochondria Key Player. *Frontiers in Oncology*, 9, 348. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00348>
- Oktaviana, N. A., Mar'ah, N. H., & Putra, R. F. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Terpurifikasi Daun Jeruk Lemon dengan Metode DPPH. *Journal Mantra Bakti*.
- Park, J. H., Kim, S., & Lee, Y. S. (2019). Comparative Analysis of DNA Purification Methods: Impact of Organic Solvent Combinations on DNA Quality. *Journal of Biotechnology*, 280, 1-9.
- Pertiwi, N.P.N., Mahardika I.G.N.K., dan Watiningsih N.L. (2015). Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochormide (DOTTY BACK) untuk identifikasi spesies secara molekular. *Jurnal Biologi* 19 (2). 1-5
- Petroni, G., Buqué, A., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). Immunomodulation by targeted anticancer agents. *Cancer Cell*, 39(3), 310–345. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.009>.
- Retnaningati, D. (2020). Optimasi Metode Ekstraksi DNA pada Melon (*Cucumis Melo L.*) Berdasarkan Suhu Lama Inkubasi, dan Kondisi daun. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 5(2), 109-114.
- Steck, S. E., & Murphy, E. A. (2020). Dietary patterns and cancer risk. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0227-4>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.

CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

- Triani, N. (2020). Isolasi DNA Tanaman Jeruk Dengan Menggunakan Metode CTAB. *Jurnal Teknologi Terapan*.
- World Health Organization. (2022). Breast cancer. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Yuan, C., Chen, G., Jing, C., Liu, M., Liang, B., Gong, G., & Yu, M. (2021). Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(1), e22943. <https://doi.org/10.1002/jbt.22943>
- Zhou, Q., Xu, H., Yu, W., Li, E., & Wang, M. (2019). Anti-inflammatory effect of an apigenin-Maillard reaction product in macrophages and macrophage-endothelial cocultures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.



© 2025 by authors. Content on this article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International license. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).