

Optimasi Inkubasi Isolasi DNA pada Tahapan Digestion Solution terhadap Konsentrasi DNA Nyamuk *Aedes* sp.

*Optimization of DNA Isolation Incubation at Digestion Solution Stage on DNA Concentration of *Aedes* sp. Mosquito.*

Azzahra Noor Firanti ¹⁾

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang
Email: zahranoona21@gmail.com

ABSTRAK

Proses isolasi DNA merupakan tahap penting dalam analisis molekuler. Namun, kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh spesies dan kondisi sampel yang digunakan. Oleh karena itu, diperlukan optimasi terhadap tahapan-tahapan dalam proses isolasi, salah satunya adalah pada tahap inkubasi dengan *digestion solution*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu inkubasi optimum dalam tahapan *digestion solution* guna memperoleh DNA berkualitas tinggi dari nyamuk *Aedes* sp. Metode yang digunakan bersifat kualitatif dengan membandingkan dua perlakuan, yaitu inkubasi selama 3 jam dan inkubasi *overnight*. Sampel yang digunakan adalah nyamuk *Aedes* sp. DNA diekstraksi menggunakan kit isolasi DNA komersial seperti *GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit*, kemudian dianalisis kuantitas dan kualitasnya menggunakan NanoDrop. Data hasil pengukuran disajikan dalam bentuk tabel untuk dibandingkan antara kedua perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa inkubasi selama 3 jam menghasilkan konsentrasi DNA yang rata-rata di atas 10 ng/μl serta nilai kemurnian (rasio A260/A280) dalam rentang 1,8–2,0, yang menunjukkan DNA berkualitas baik dan sesuai standar untuk aplikasi molekuler lebih lanjut. Sebaliknya, inkubasi *overnight* cenderung menghasilkan DNA dengan konsentrasi yang lebih rendah dan kemurnian di luar rentang ideal. Dengan demikian, waktu inkubasi selama 3 jam dapat direkomendasikan sebagai kondisi optimum dalam tahap *digestion solution* untuk isolasi DNA nyamuk *Aedes* sp.

Keywords: isolasi DNA, inkubasi, *digestion solution*, nyamuk *Aedes* sp., konsentrasi DNA

PENDAHULUAN

Isolasi DNA merupakan metode penting yang digunakan untuk memperoleh DNA dari jaringan dengan cara memisahkan DNA dari membran sel, protein, serta komponen seluler lainnya (Paradisa, *et.al.*, 2024). Isolasi DNA dapat dilakukan secara konvensional ataupun menggunakan kit komersial (Wasdili, *et.al.*, 2022). Tujuannya adalah untuk pengaplikasian analisis molekuler dan rekayasa genetika seperti genome editing, transformasi dan PCR. Isolasi DNA memiliki berbagai metode yang dapat digunakan tergantung kebutuhan dan karakteristik dari sampelnya. Secara umum semua

metode tersebut memiliki tahapan dasar yang serupa, yaitu pelisisan sel atau jaringan yang efektif, denaturasi kompleks nukleoprotein, dan inaktivasi nuklease.

Tahap pelisisan ini merupakan langkah awal yang sangat penting karena menentukan keberhasilan proses isolasi DNA. Saat proses lisis sel, buffer ekstraksi yang berisi larutan EDTA akan mencegah dan merusak enzim nuklease, sehingga aktivitas endonuklease yang terdapat dalam sel dan jaringan dapat ditekan atau bahkan dihilangkan. Inkubasi pada suhu 55 °C akan memungkinkan Proteinase-K berfungsi secara maksimal dan efektif dalam memecah protein serta menginaktivasi enzim nuklease yang mampu merusak DNA (Hariyadi, *et.al.*, 2018). Kemudian pemberian RNase dilakukan untuk menghilangkan RNA, sehingga yang tersisa adalah fragmen DNA. Setelah DNA terlarut, DNA akan diendapkan menggunakan etanol dan dapat direhidrasi kembali dengan air (Romadhona, *et.al.*, 2024). Setiap tahapan itu, sampel harus disentrifugasi untuk memisahkan sel dari komponen yang ada di sampel berdasarkan jenis molekul (Putri & Achyar, 2023). Untuk menentukan kualitas DNA yang dihasilkan, baik dari segi konsentrasi maupun kemurniannya diperlukan optimasi.

Optimasi isolasi DNA perlu dilakukan pada spesies atau kondisi spesimen tertentu agar mendapatkan DNA yang ideal untuk proses amplifikasi (Ningtias, *et.al.*, 2021). Salah satu sampel yang dapat dioptimasi yaitu DNA nyamuk. Nyamuk ini diketahui sebagai vektor utama penyebaran virus penyebab demam berdarah dengue (DBD), yang merupakan salah satu masalah kesehatan serius di Indonesia (Nuryady, *et.al.*, 2025). Penelitian terkini menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes* sp. yang diinfeksi dengan bakteri *Wolbachia* dapat menurunkan kemampuan penyebaran virus dengue, dan menjadi pendekatan inovatif dalam pengendalian DBD. *Wolbachia* merupakan genus bakteri alami yang berperan sebagai parasit untuk arthropoda dan menginfeksi hampir setengah dari seluruh spesies serangga. *Wolbachia* dapat mengganggu proses reproduksi nyamuk, memengaruhi siklus hidup nyamuk, serta menghambat replikasi virus dengue dalam tubuh nyamuk. Dengan keberadaan bakteri *wolbachia* pada nyamuk *Aedes*, nyamuk tersebut tidak dapat menyebarkan virus dengue (Amrullah, *et.al.*, 2024).

Untuk mendukung aplikasi itu, identifikasi keberadaan *Wolbachia* dalam tubuh nyamuk sangat bergantung pada isolasi DNA. DNA yang murni, utuh, dan tanpa kontaminan sangat penting untuk menjamin keberhasilan deteksi molekuler terhadap gen-gen tertentu pada *Wolbachia* maupun hostnya. Dalam proses isolasi ini, salah satu langkah penting adalah inkubasi dengan *digestion solution*, yang berfungsi untuk memecah jaringan tubuh nyamuk dan melepaskan material genetik dari sel. Dengan demikian, pengoptimalan tahap ini menjadi hal penting dalam mendapatkan konsentrasi DNA yang baik untuk analisis molekuler selanjutnya. Oleh karena itu, tujuan dari

penelitian ini adalah melakukan optimasi inkubasi isolasi DNA pada tahapan Digestion Solution untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi dari nyamuk *Aedes* sp.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian berupa metode kualitatif dengan melakukan optimasi inkubasi isolasi DNA pada tahapan *digestion solution* nyamuk *Aedes* sp. Kegiatan ini dilaksanakan pada tanggal 06 Januari – 14 Februari 2025 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Analisis data disajikan dalam bentuk tabel.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada metode Optimasi Isolasi DNA adalah Mikropipet, *Micropestle*, *Drybath Incubator*, *Vortex*, *Microtube*, *Centrifuge*, *Tips*, *Microtube rack*, *NanoDrop* dan *Stopwatch*. Bahan yang digunakan adalah sampel nyamuk *Aedes* sp. dan *GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit*.

Prosedur Kerja

Penelitian ini diawali dengan persiapan 16 sampel nyamuk *Aedes* sp. yang dikoleksi dari dua lokasi berbeda, yaitu Solok dan Padang, masing-masing sebanyak 8 ekor. Seluruh sampel disimpan dalam freezer bersuhu -20°C hingga waktu isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan menggunakan *GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit*. Setiap sampel dihancurkan dalam 180 µl *Digestion Solution*, kemudian ditambahkan 20 µl Proteinase K dan dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 56°C selama 3 jam dan *overnight*. Setelah inkubasi, 20 µl RNase A ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, 200 µl *Lysis Solution* dan 400 µl ethanol ditambahkan secara bertahap dan dihomogenkan. Lysat yang telah terbentuk dipindahkan ke kolom pemurnian DNA dan disentrifugasi. Proses pencucian dilakukan dua kali menggunakan *Wash Buffer 1* dan *Wash Buffer 2*, masing-masing disertai sentrifugasi sesuai instruksi kit. Setelah residu dibersihkan, DNA dielusi menggunakan 50 µl *Elution Buffer*, diinkubasi selama 2 menit, lalu disentrifugasi kembali. Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur menggunakan spektrofotometer *NanoDrop*. Sebelumnya, alat dikalibrasi menggunakan 1 µl *Nuclease-Free Water*, kemudian pembacaan dilakukan pada panjang gelombang 260/280 nm menggunakan 1 µl sampel DNA.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Nilai Konsentrasi dan Kemurnian DNA Nyamuk *Aedes* sp. dengan perlakuan Inkubasi *Digestion Solution Overnight*

No.	Sampel	Konsentrasi	A260	A280	A260/A280
1.	SLK 6	28,2 ng/ μ	0,565	0,297	1,9
2.	SLK7	8,4 ng/ μ l	0,168	0,085	1,96
3.	SLK 8	2,5 ng/ μ l	0,05	0,027	1,8
4.	SLK 9	6,4 ng/ μ l	0,128	0,075	1,72
5.	SLK 10	2,9 ng/ μ l	0,057	0,041	1,4
6.	SLK 12	31,1 ng/ μ l	0,622	0,329	1,89
7.	SLK 14	3,6 ng/ μ	0,072	0,038	1,88
8.	SLK 16	5,4 ng/ μ l	0,108	0,056	1,94

Tabel 2. Nilai Konsentrasi dan Kemurnian DNA Nyamuk *Aedes* sp. dengan Perlakuan Inkubasi *Digestion Solution* selama 3 Jam

No.	Sampel	Konsentrasi	A260	A280	A260/A280
1.	PDG 3	10, 1ng/ μ	0,203	0,102	1,99
2.	PDG 4	18,7 ng/ μ l	0,373	0,198	1,89
3.	PDG 8	16,5 ng/ μ l	0,329	0,176	1,87
4.	PDG 11	14,9 ng/ μ l	0,297	0,161	1,84
5.	PDG 14	11 ng/ μ l	0,22	0,11	1,99
6.	PDG 19	23,7 ng/ μ l	0,474	0,261	1,82
7.	PDG 21	9,2 ng/ μ	0,183	0,101	1,81
8.	PDG 22	13,9 ng/ μ l	0,278	0,148	1,87

Tujuan dalam pengukuran konsentrasi DNA yaitu untuk mengetahui banyaknya DNA yang terkandung dalam larutan isolat DNA (Arini & Achyar, 2023). Konsentrasi

DNA didapatkan dari nilai berat DNA setiap 1 mikroliter (Handayani & Putri, 2021). Berdasarkan pada data diatas, terlihat bahwa konsentrasi DNA nyamuk tertinggi pada sampel SLK 12 (31,1 ng/μl) dan SLK 6 (28,2 ng/μl) pada perlakuan inkubasi *overnight*. Standar konsentrasi DNA dapat dinilai bagus, apabila DNA yang diisolasi mempunyai konsentrasi di atas 20 ng/μl (Sophian & Syukur, 2021). Namun, pada perlakuan inkubasi *overnight* tidak semuanya memiliki konsentrasi tinggi. Konsentrasi yang tinggi pada sampel SLK 12 dan SLK 6 dikarenakan sampel nyamuk memiliki tubuh yang lebih besar sehingga membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Sedangkan pada perlakuan inkubasi selama 3 jam, rata-rata sampelnya memiliki konsentrasi yang tinggi. Pada inkubasi selama 3 jam konsentrasi DNA nyamuk tertinggi terdapat pada sampel PDG 19 (23,7 ng/μl) dan sampel PDG lain rata-rata memiliki konsentrasi DNA diatas 10 ng/μl. Dengan ukuran nyamuk yang kecil, maka sedikit sulit untuk mendapatkan DNA total yang berkualitas tinggi (Mustafa, *et.al.*, 2016).

Sampel nyamuk memiliki ukuran yang lebih kecil sehingga seharusnya tidak membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama untuk melisiskan sel. Sehingga apabila tahap pelisisan membutuhkan waktu yang lebih lama maka kemungkinan DNA yang berada di dalam sel juga ikut terdegradasi sehingga menurunkan konsentrasi DNA. Karena itulah perlakuan inkubasi selama 3 pada tahapan *digestion solution* lebih efektif dalam isolasi DNA nyamuk dibandingkan dengan inkubasi *overnight*. Selain itu, variasi konsentrasi DNA pada setiap sampel dapat dipengaruhi oleh perlakuan fisik yang dilakukan serta efektifitas buffer ekstraksi dalam menghancurkan sel. Penggerusan sampel secara optimal secara fisik dapat membantu buffer ekstraksi bekerja lebih efisien dalam memecah struktur sel (Sirait *et.al.*, 2024). Keefektifan ini tidak hanya ditunjukkan oleh tingginya konsentrasi DNA, tetapi juga oleh kualitas DNA yang dihasilkan.

Kuantitas dan kualitas DNA yang telah diekstraksi dapat dianalisis menggunakan Nanophotometer. Metode pengukuran jumlah DNA dengan Nanophotometer berlandaskan pada fakta bahwa radiasi sinar ultraviolet (UV) diserap oleh protein dan nukleotida dalam larutan. Leninger (1975) dalam Sirwati *dkk* (2024) mengungkapkan bahwa dari lima jenis nukleotida yang membentuk DNA atau RNA, ketika absorbansinya diukur pada panjang gelombang A260/A280 akan menghasilkan nilai yang berbeda-beda, yaitu: guanine (1,15), adenin (4,50), sitosin (1,51), urasil (4,00), dan timin (1,47). Analisis kemurnian yang diperoleh dari pembacaan absorbansi merupakan rata-rata nilai absorbansi dari lima asam nukleat ini. Ini menjadi dasar penentuan kemurnian umum dalam analisis DNA yang berada dalam rentang 1,8-2,0.

Pada perlakuan inkubasi selama 3 jam memiliki kualitas DNA yang lebih baik dibandingkan dengan inkubasi *overnight*. Hal ini terlihat dari data panjang gelombang

A260/280 yang menunjukkan kemurnian DNA nyamuk dengan perlakuan inkubasi selama 3 jam, dimana kemurniannya berada di rentang 1,8-2,0 yang sesuai dengan standar. Secara prinsip penyerapan pada panjang gelombang 260 nm mewakili keberadaan DNA, sedangkan absorbansi pada 280 nm menunjukkan keberadaan protein. Oleh karena itu, rasio A260/280 yang idealnya berada di sekitar 1,8-2,0 untuk DNA murni (Retnaningati, 2020). Jika nilai rasio tersebut berada di bawah 1,8 maka hal ini mengindikasikan sampel DNA terkontaminasi protein. Sebaliknya, rasio yang melebihi 2,0 menunjukkan kemungkinan kontaminasi RNA. Pada perlakuan inkubasi *overnight* terdapat sampel yang memiliki nilai absorbansi dibawah 1,8 yaitu pada sampel SLK 10 (1,4) dan SLK 9 (1,72). Ini mengindikasikan bahwa DNA dari sampel tersebut sudah terkontaminasi protein, yang berdampak pada penurunan kualitas hasil isolasi. Hal ini membuktikan bahwa durasi inkubasi yang lebih singkat pada sampel nyamuk, yakni selama 3 jam, tidak hanya menghasilkan konsentrasi DNA yang tinggi, tetapi juga kemurnian DNA yang lebih baik dibandingkan dengan inkubasi *overnight*.

PENUTUP

Berdasarkan hasil dari penelitian Optimasi Inkubasi Isolasi DNA pada Tahapan Digestion Solution Nyamuk *Aedes* sp. dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi optimum pada tahapan *digestion solution* untuk isolasi DNA nyamuk *Aedes* sp. adalah selama 3 jam, ditunjukkan oleh konsentrasi DNA rata-rata di atas 10 ng/μl dan tingkat kemurnian dalam rentang 1,8–2,0, yang sesuai dengan standar kualitas DNA.

REFERENSI

- Amrullah, A. A., Safitriani, V. A., Rohadatul'Aisy, A., Rajebta, N. A., & Karimah, A. S. (2024). Penyebaran Nyamuk *Wolbachia* Sebagai Pencegahan Demam Berdarah dalam Perspektif Prinsip Etika Beneficence. *Innovative: Journal Of Social Science Research*, 4(3), 15341-15349.
- Arini, N., & Achyar, A. (2023). Optimization of Deoxyribonucleic Acid (DNA) isolation methods from several types of cosmetic samples for molecular-based halal tests. *Journal of Halal Product and Research (JHPR) Volume*, 6(1).
- Handayani, S. O., & Putri, D. H. (2021). Comparison of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsicum annum* L.) Plant DNA Isolation. *Jurnal Serambi Biologi*, 6(2), 37-41.
- Hariyadi, S., Narulita, E., & Rais, M. A. (2018, October). Perbandingan metode lisis jaringan hewan dalam proses isolasi DNA genom pada organ liver tikus putih (*Rattus norvegicus*). In *Proceeding Biology Education Conference* (Vol. 15, No. 1, pp. 689-692)

- Mustafa, H., Rachmawati, I., & Udin, Y. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk. *Jurnal Vektor Penyakit*, 10(1), 7-10.
- Ningtias, A. S., Prihatini, I., & Qiptiyah, M. (2021). Isolasi non-destruktif dan destruktif gen coi pada serangga jenis Coleoptera pembawa patogen *Ceratocystis*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 15(1), 1-11.
- Nuryady, M. M., Purwanti, E., Aldina, S. N., Wahyuni, S., Permana, T. I., Khoiriyah, Z., & Ariesaka, K. M. (2025). Desain Primer PCR Spesifik Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen COX-1 (Cytochrome Oxidase Subunit I) DNA Mitokondria Pada *Aedes aegypti*. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 18(1), 23-32.
- Paradisa, Y. B., Hidayat, S. H., Saputra, A., Hartati, N. S., Prananingrum, P., Herliana, L., ... & Adi, E. B. M. (2024, July). Evaluation of three different DNA extraction methods for the detection of Pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) by Polymerase Chain Reaction. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1377, No. 1, p. 012106). IOP Publishing.
- Putri, A., & Achyar, A. (2023). Optimasi Isolasi DNA Bakteri Patogen pada Sampel Air Sungai Berbasis PCR. *Jurnal Serambi Biologi*, 8(4), 471-475.
- 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*, 109-114.
- Romadhona, H. A., Qushayyi, M. F., & Sari, R. Y. (2024). Rekayasa Genetik pada Nyamuk Penyebab Malaria: Kajian Literatur. *Jurnal Pendidikan Ilmu Pengetahuan Alam (JP-IPA)*, 5(1), 7-17
- Sirait, P. S., & Sulistiawati, S. (2024). Effect of Different Isolation Methods on DNA Quality of Snakehead Fish (*Ophiocephalus* sp.). *Journal of Global Sustainable Agriculture*, 4(1), 96-100.
- Sirwati, F., Nurfalinda, S., Salsabila, S., & Putri, D. (2024). Comparison of Boiling Methods for Bacterial DNA Isolation Using Waterbath and Heatblock. *Jurnal Serambi Biologi*, 9(1), 115-118.
- 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.
- Wasdili, F. A. Q., Putri, A. S., & Romlah, S. (2022). Optimasi Isolasi DNA Genom *Candida albicans* dengan Metode Litium Karbonat. *Anakes: Jurnal Ilmiah Analis Kesehatan*, 8(2), 160-168.