

Perbandingan Metoda Ekstraksi DNA Saliva

Yani Putri Utama, Afifatul Achyar, Ira Wahyuni

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang

Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang

Email: yaniputriutama07@gmail.com

ABSTRAK

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan bagian dari sel yang dapat dipakai sebagai alat identifikasi suatu organisme termasuk manusia. atau isolasi DNA adalah metode pemurnian DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metoda atau perlakuan yang terbaik untuk mendapatkan kemurnian DNA terbaik. Metode yang dilakukan yaitu membandingkan volume saliva yang digunakan dan elution buffer yang dipanaskan atau yang tidak dipanaskan. Hasil yang didapat pada penelitian ini ialah kemurnian DNA terbaik diperoleh pada perlakuan volume saliva tertinggi dan elution buffer dipanaskan.

Kata kunci : Isolasi, DNA, Saliva

PENDAHULUAN

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan bagian dari sel yang dapat dipakai sebagai alat identifikasi suatu organisme termasuk manusia. Penggunaan DNA sebagai alat identifikasi dikarenakan keidentikannya pada setiap sel pada satu organisme atau dapat ditelusuri kesamaannya pada beberapa generasi yang mempunyai hubungan kekerabatan. Karena keidentikan dari DNA pada setiap sel pada satu organisme, maka bagian sel manapun dari tubuh dapat dipakai sebagai sampel (Ahda et al., 2012).

Ekstraksi atau isolasi DNA adalah metode pemurnian DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Friedrich Miescher pada tahun 1869 melakukan isolasi DNA untuk pertama kalinya (Gupta,2019).

Isolasi DNA/RNA merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam rekayasa genetika sebelum melangkah ke proses selanjutnya. Prinsip dasar isolasi total DNA/RNA dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA, dan RNA. Kemudian ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA/RNA total. Prinsip-prinsip isolasi DNA plasmid hampir sama dengan isolasi total DNA/RNA dari jaringan.

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Isolasi sel; (2) Lisis dinding dan membran sel; (3) Ekstraksi dalam larutan; (4) Purifikasi; dan (5) Presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada 2, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip

utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (rotation per minute) atau 3000 rpm (Faatih, 2009). Secara umum prosedur ekstraksi DNA yang baik mencakup tiga hal penting yaitu penghancuran (lisis), pemisahan DNA dari komponen lain dan pemurnian DNA, sehingga mampu menghasilkan DNA dengan kemurnian tinggi, DNA harus utuh, dan konsentrasi tinggi (Fitriyani et al., 2022).

Teknik ekstraksi DNA meliputi ekstraksi organik (metode fenol-kloroform), metode non-organik (pengolahan salting dan proteinase K), dan metode adsorpsi (membran silika-gel). Pada ekstraksi organik lisis sel dapat dilakukan dengan menggunakan deterjen nonionik (natrium dodesil sulfat), Tris-Cl, dan Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), dan langkah ini diikuti dengan penghilangan sisa-sisa sel dengan sentrifugasi. Perlakuan protease kemudian digunakan untuk mendenaturasi protein. Pelarut organik seperti kloroform, fenol, atau campuran fenol dan kloroform (rasio fenol/kloroform/isoamil alkohol adalah 25:24:1) digunakan untuk denaturasi dan pengendapan protein dari larutan asam nukleat, dan protein yang terdenaturasi dihilangkan dengan sentrifugasi dan langkah mencuci. Perawatan rna dilakukan untuk menghilangkan RNA yang tidak diinginkan. Pengendapan dengan etanol dingin dilakukan untuk memekatkan DNA. Endapan asam nukleat terbentuk bila terdapat kation monovalen (garam) dengan konsentrasi sedang. Endapan ini dapat diperoleh kembali dengan sentrifugasi dan dilarutkan kembali dalam buffer TE atau air suling ganda (Gupta, 2019).

Metode CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) merupakan metode yang paling umum dilakukan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol. Metode CTAB akan menghasilkan pita DNA yang berukuran tebal dan dapat memisahkan DNA dari polisakarida yang disebabkan adanya perbedaan karakteristik kelarutan. Selain itu, juga diperoleh RNA dengan pita tipis yang terletak jauh berada di bawah pita DNA. Metode fenol-kloroform merupakan metode standar untuk ekstraksi DNA. Metode ini sudah jarang digunakan akhir-akhir ini dikarenakan menggunakan fenol yang memiliki sifat toksik (Handayani & Putri, 2021)

Menilai kualitas dan hasil DNA: Kualitas dan hasil DNA dinilai dengan spektrofotometri atau elektroforesis gel. Spektrofotometri melibatkan estimasi konsentrasi DNA dengan mengukur jumlah cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu. Puncak serapan asam nukleat berada pada ~260 nm. Rasio A_{260} / A_{280} adalah ~1,8 untuk DNA. Ransum yang kurang dari 1,7 menunjukkan

kontaminasi protein (Gupta, 2019). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metoda atau perlakuan yang terbaik untuk mendapatkan kemurnian DNA terbaik.

METODE PENELITIAN

Kegiatan Kerja Praktek dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Kegiatan Kerja Praktek dilaksanakan pada tanggal 22 Juni – 22 Juli 2023. Pada penelitian ini terdapat 4 perlakuan saliva yaitu a) Saliva 500 ul + buang supernatan + 200 µl pbs + sentrifugasi 5000x rpm 5 menit (Elution buffer tidak dipanaskan), b) Saliva 500 ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + 200 µl pbs + buang supernatant (Elution buffer dipanaskan), c) Saliva 700 ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + 200 µl pbs + buang supernatant (Elution buffer dipanaskan), d) Saliva 1.200ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + 200 µl pbs + buang supernatant (Elution buffer dipanaskan).

Bahan yang digunakan adalah sampel dari cairan saliva. Alat yang digunakan ialah *heater, vortex, microtube, micropipet, nanodrop, centrifuge, GeneJET Genomic DNA Purification kit*.

Prosedur kerja

- 1) Perlakuan saliva
- 2) Menambahkan 400 ul lysis solution dan 20 ul proteinase K solution ke sampel saliva
- 3) Inkubasi sampel pada suhu 56 C selama 10 menit dan di vortex tiap 3 menit sekali.
- 4) Menambahkan 200 ul etanol lalu di vortex
- 5) Pindahkan sampel ke GeneJET Genomic DNA Purification Column yg disertai collection tube (tabung penampung), sentrifus selama 1 menit pada kecepatan 6000x g. lalu keluarkan dan pindahkan GeneJET Genomic DNA Purification Column ke collection tube 2 ml yang baru.
- 6) Menambahkan wash buffer I (yang telah ditambahkan etanol), sentrifuge selama 1 menit pada 8000x g.
- 7) Pindahkan purification column ke collection tube baru.
- 8) Menambahkan 500 ul wash buffer II ke GeneJET Genomic DNA Purification Column, sentrifus selama 3 menit pada kecepatan maksimal 12000x g. jika residu masih terlihat pada purification column maka , kosongkan collection tube lalu sentrifus selama 1 menit pada kecepatan maksimum. Lalu pindahkan GeneJET Genomic DNA Purification Column ke 1,5 ml tabung sentrifus steril.
- 9) Menambahkan 200 ul elution buffer ke tengah-tengah GeneJET Genomic DNA Purification Column untuk melulusi DNA genomic, inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang dan sentrifus selama 1 menit pada 8000x g.
- 10) Keluarkan purification column , lalu gunakan DNA yang telah tersaring di tabung sentrifus.

11) Cek kemurnian menggunakan nanodrop.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA adalah metode pemurnian DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya (Gupta, 2019). Isolasi DNA bertujuan untuk mendapatkan DNA murni dari suatu sampel biologis sehingga nantinya dapat dilakukan analisis genetic. Langkah pertama yang dilakukan dalam isolasi DNA adalah melisiskan dinding atau membran sel (Ruchi et al., 2019). Beberapa sampel yang saya gunakan pada saat KP di Laboratorium Biomedik yaitu saliva. Isolasi saliva memakai kit isolasi GeneJET Genomic DNA Purification.

Kemurnian DNA di cek dengan alat spektrofotometer Nanodrop. Alat ini memiliki prinsip dengan menghitung perbedaan penyerapan cahaya UV dimana pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol akan menyerap cahaya dengan panjang gelombang 280 nm. Kemurnian DNA dapat diukur dengan rasio absorbansi terhadap panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, kemurnian DNA yang baik adalah 1,8-2,0 (Dewanata & Mushlih, 2021). Keberhasilan isolasi DNA sangat ditentukan oleh kuantitas dan kualitas sel yang diisolasi. Semakin banyak jumlah sel sumber DNA dan semakin baik kualitas sel tersebut dalam arti tidak terkontaminasi dengan sel dari organisme lain atau bahan-bahan pengganggu lainnya, maka semakin banyak jumlah dan bagus kualitas DNA yang didapatkan (Ahda et al., 2012).

Hasil isolasi DNA dikatakan murni apabila rasio absorbansinya berada pada 1,8 – 2,0. Dari data rentang rasio absorbansinya yang paling rendah yaitu 1,18 dan yang paling tinggi yaitu 3,19. Apabila DNA terkontaminasi protein dan polisakarida, nilai absorbansinya kurang dari 1,8 dan apabila DNA terkontaminasi RNA maka nilai absorbansinya lebih dari 2,0 (Dewanata & Mushlih, 2021). Pengukuran konsentrasi DNA adalah bertujuan untuk mengetahui banyaknya DNA yang terkandung dalam larutan isolat DNA (Nafisa Arini & Afifatul Achyar, 2023).

Berdasarkan data kemurnian DNA terbaik diperoleh pada perlakuan isolasi DNA saliva dengan volume cairan Saliva 1.200ul dan elution buffer dipanaskan, terlihat pada tabel rata-rata rasio absorbansinya adalah 1,9. Sementara untuk volume cairan saliva 700 ul dan elution buffer dipanaskan menunjukkan hasil yang didominasi 1,8 namun masih ada yang berada pada rasio dibawah 1,8. Selanjutnya untuk hasil absorbansi pada volume cairan saliva 500 ul dan elution buffer dipanaskan, terlihat bahwa rasio absorbansinya rata-rata dibawah 1,8 dan terdapat juga yang diatas 2. Sedangkan untuk hasil absorbansi pada volume cairan saliva 500 ul dan elution buffer tidak dipanaskan menunjukkan rasio absorbansi lebih rendah dibanding semua perlakuan yaitu di bawah 1,8. Jadi dapat disimpulkan dari data tersebut bahwa volume cairan saliva yang lebih

banyak dan elution buffer dipanaskan memperlihatkan rasio absorbansi lebih baik atau kemurnian yang baik.

Tabel 1. Hasil Spektrometer Nanodrop

Perlakuan sampel	Kode Sampel	Konsentrasi	260/280
Saliva 500ul + pbs di awal+ sentrifugasi 5000x rpm 5 menit + elution buffer tidak dipanaskan	NP5	0,4	1,18
	NP6	2,1	1,53
	NP7	9	1,61
	NP8	22,1	1,88
	NP10	1,2	1,36
	NP11	1,1	1,21
Saliva 500ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + pbs + elution buffer dipanaskan	NP13	2,2	1,94
	NP14	3,9	2,12
	NP15	2,9	1,72
	NP16	9,5	1,72
	NP17	32,3	1,84
	NP12	1,6	2,44
Saliva 700ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + pbs + elution buffer dipanaskan	P5	78	1,55
	P6	86,3	1,83
	P7	131,8	1,84
	P8	88,9	1,89
	P9	2,5	1,56
	P10	7,7	1,87
Saliva 1.200ul + sentrifugasi 10.000x rpm 5 menit + pbs + elution buffer dipanaskan	P27	73,2	1,96
	P28	84	1,94
	P30	68,1	1,87
	P31	50,3	1,97
	P33	74,2	1,93
	P34	147	1,92
	P35	96,5	1,96
	P29	49,5	1,8
	P32	44,2	2,15
	P37	8,6	3,19
P36	45,9	2	

Pada saat isolasi elution buffer yang dipanaskan akan meningkatkan hasil

konsentrasi DNA sebesar 20–40%. Untuk aplikasi yang memerlukan konsentrasi DNA tinggi, menggunakan volume elusi yang kecil dan kemudian mengelusi lagi dengan eluat dapat meningkatkan hasil (10%), jadi elution buffer yang dipanaskan mempengaruhi kemurnian DNA yang terbentuk. Selain itu faktor-faktor yang mempengaruhi kemurnian dan konsentrasi DNA adalah jenis bahan kimia (PVP, fenol, dan NaCl), konsentrasi bahan kimia, serta perlakuan pada kondisi dingin untuk mencegah bekerjanya enzim restriksi endonuklease.

PENUTUP

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas diketahui bahwa kemurnian DNA terbaik terdapat pada perlakuan volume cairan saliva yang tertinggi yaitu 1200 ul dengan elution buffer yang dipanaskan , rata – rata rasio kemurnian yang didapatkan ialah 1,9 yang dimana berada dalam rentang rasio absorbansi terbaik.

REFERENSI

- Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3), 463-499.
- Crowther, J. R. 2001. *The Elisa Guidebook*. New Jersey: Humana Press.
- Johnson, B.H. and Hecht, M.H. 1994. Recombinant Proteins Can Be Isolated From E. Coli Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Biotechnology* 12(13): 1357-60.
- Li, Y., & Schluesener, H. (2013). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6), 626-634.
- Ahda, Y., Rozi Muharni, I., & Hilda Putri, D. (2012). Kualitas Dna Hasil Isolasi Dari Beberapa Bagian Batang Rambut Untuk Bahan Analisis Dna Forensik. *Eksakta*, 1, 88–92.
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 1–10. <https://doi.org/10.21070/ijins.v15i.553>
- Faatih, M. (2009). Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J Penelitian Sains Dan Teknologi*, 20(1), 61–67.
- Fitriyani, R., Achyar, A., & Robiansyah, I. (2022). *Tropical genetics*. 2(1), 17–21.
- Handayani, S. O., & Putri, D. H. (2021). Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum* L.).

Serambi Biologi, 6(2), 37–41.

- Nafisa Arini, & Afifatul Achyar. (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*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.20473/jhpr.vol.6-issue.1.1-10>
- Ruchi, W., Putri, D. H., & Anhar, A. (2019). Comparison of Three Different DNA Isolation Methods To Degradate The Trichoderma Fungi Cell Wall. *Bioscience*, 3(1), 50. <https://doi.org/10.24036/0201931102859-0-00>