

## ISOLASI DNA RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* DENGAN MEMBANDINGKAN METODE FENOL KLOROFORM DENGAN METODE WATTIER

Mujayana dan Rifka Pasande

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau  
Jl. Makmur Dg. Sitakka No.129, Maros 90512, Sulawesi Selatan

### ABSTRAK

Isolasi DNA merupakan langkah awal yang harus dilakukan dalam rekayasa genetika sebelum melangkah ke proses selanjutnya. Prinsip dasar isolasi DNA dari jaringan adalah memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak dari sel-sel jaringan, *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA). Kemudian ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA total. Isolasi DNA rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dilakukan dengan menggunakan metode fenol kloroform dan metode Wattier. Tujuannya adalah membandingkan kedua metode dalam mendapatkan hasil isolasi dengan tingkat kemurnian yang tinggi dan efisien dalam penggunaan bahan dan waktu. Metode Wattier lebih efisien digunakan baik dari segi waktu maupun dari segi bahan jika dibandingkan dengan menggunakan metode fenol kloroform. Hasil isolasi memperlihatkan pita genom DNA yang lebih bersih. Pengukuran kemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan *genequant*, diperoleh tingkat kemurnian rata-rata DNA 1,81 untuk metode modifikasi dan 1,83 untuk metode fenol kloroform.

**KATA KUNCI:** isolasi DNA, *K. alvarezii*, fenol kloroform, Wattier

### PENDAHULUAN

Rumput laut *Kappaphycus alvarezii* termasuk alga merah (*Rhodophyceae*) yang merupakan salah satu komoditas unggulan penghasil karaginan yang banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, farmasi, kosmetik, tekstil, dan cat (Angka & Suhartono, 2000).

Perbedaan kualitas produksi dan karakteristik morfologi pada beberapa lokasi budidaya selain dipengaruhi oleh faktor lingkungan juga dipengaruhi oleh faktor genetik rumput laut itu sendiri. Untuk mengetahui karakteristik genetik rumput laut diperlukan teknik isolasi DNA yang tepat untuk mendapatkan kemurnian DNA yang tinggi. DNA merupakan suatu polimer besar dengan karakteristik fisik yang unik. Eksploitasi ukuran dan struktur kimia DNA dapat dilakukan dengan isolasi dan purifikasi. Kemurnian genom hasil ekstraksi selain dianalisis secara kualitatif

dengan metode elektroforesis juga diukur secara kuantitatif melalui metode ultra violet (UV) spektrofotometri pada rasio absorban 260 nm dan 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ). Selain menggunakan alat spektrofotometer, kemurnian juga dapat diukur dengan menggunakan alat *genequant* dengan prinsip yang sama.

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

Isolasi DNA rumput laut *K. alvarezii* dilakukan dengan menggunakan metode fenol kloroform dan metode Wattier. Isolasi DNA

dari alga merah sangat sulit karena adanya kandungan agar dan karaginan yang juga dapat terisolasi. Senyawa ini memiliki viskositas yang tinggi dan dapat menghambat aktivitas endonuklease dan polimerisasi DNA. Menurut Sosa & Oliveira (1992), dan Chesnick & Cottolico (1993) dalam Wattier *et al.* (2000), menyatakan bahwa kandungan polisakarida yang tinggi dapat dihilangkan dengan menggunakan ultrasentrifugasi CsCl secara *bergradien*, purifikasi dengan elektroforesis gel agarosa, atau purifikasi dengan kolom *hidroksiapatite*. Selain itu, Tenriulo *et al.* (2001) telah berhasil mengekstraksi DNA dari *K. alvarezii* dengan kemurnian yang baik menggunakan metode fenol kloroform yang telah dimodifikasi dengan penambahan kalium asetat untuk mengurangi kandungan polisakaridanya. Namun metode ini membutuhkan waktu yang relatif lebih lama dan membutuhkan bahan yang banyak.

Tujuan percobaan ini adalah membandingkan kedua metode untuk mendapatkan hasil isolasi dengan tingkat kemurnian yang tinggi dan efisien dalam penggunaan bahan dan waktu.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan antara lain sampel rumput laut *K. alvarezii*, stok *extraction buffer* (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, dan NaCl 500 mM) pH 8, larutan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 20%, proteinase-K 20 mg/mL, RNAse 20 mg/mL, *complete extraction buffer* (untuk 6 sampel, campurkan 8,16 mL stok *extraction buffer*, 0,82 mL SDS 20%, dan 15 µL proteinase-K 20 mg/mL) (larutan ini dipreparasi sesaat sebelum ekstraksi dilakukan), isopropanol dingin, etanol dingin 70 %, *buffer* TNES Urea, *buffer lysis*, proteinase-K, RNAse, *phenol : chloroform : isoamyl alcohol* (PCIA 25:24:1), *chloroform : isoamyl alcohol* (CIA 24 : 1), etanol 100 %, TE *buffer* (Tris HCl 10 mM dan EDTA 1 mM) pH 8, agarose, Tris Borat EDTA (TBE) 1x, *gel red*, *loading dye*, *marker hindIII*, dan alkohol 70%.

### Alat

Alat yang digunakan adalah *genequant*, perangkat DNA elektroforesis, dokumentasi gel biometra, *microcentrifuge*, *water bath with shaker*, neraca analitik, *microwave*, *micro*

*pipet eppendorf*, kuvet, erlenmeyer 50 mL, spatula, *syringe*, parafilm, tabung eppendorf, dan pipet tip.

## Metode

### Ekstraksi DNA dengan Menggunakan Metode Fenol Kloroform:

- ◆ Sebanyak ± 50-100 mg daging dipreservasi dengan 250 µL *buffer* TNES Urea (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 125 mM NaCl, 1% SDS, dan 6 M Urea) dalam tabung eppendorf 1,5 mL (disimpan pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi DNA).
- ◆ Ditambahkan 500 µL lisis *buffer* (0,5 M NaCl; 0,001 M EDTA; 1% SDS; 0,8% Triton X-100; dan 0,1 M Tris-HCl pH 9,0), 40 µL SDS 10%, dan 20 µL Proteinase-K (20 mg/mL).
- ◆ Diinkubasi pada suhu 55°C selama 1-3 jam kemudian ditambahkan 12,5 RNAse (20 mg/mL) dan disimpan pada suhu ruang selama 15-30 menit.
- ◆ Selanjutnya ditambahkan *Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol* 500 µL (PCIA 25:24:1) vorteks perlahan sampai homogen, didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 8 menit. Lapisan atas diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru. Penambahan PCIA diulang sekali lagi seperti sebelumnya.
- ◆ Sebanyak 1 bagian volume larutan *Chloroform : Isoamyl alcohol* (CIA 24:1), ditambahkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 4 menit.
- ◆ Lapisan atas diambil dan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 0,1 volume Kalium Asetat 5 M; 0,25 volume etanol; dan 1 volume CIA (24:1) disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 4 menit.
- ◆ Kemudian ditambahkan dengan 2 bagian volume etanol absolut dingin, di-*invert* perlahan sampai homogen. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit, cairannya dibuang.
- ◆ Pelet DNA dicuci dengan 1 mL etanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit.
- ◆ Pelet DNA dikering-anginkan pada suhu ruang kemudian ditambahkan 100 µL aquades atau *buffer* TE (10 mM Tris dan 1 mM EDTA; pH 8,0), disimpan pada suhu -20°C untuk proses selanjutnya.

### Ekstraksi DNA Rumput Laut *K. alvarezii* dengan Menggunakan Metode Modifikasi Wattier:

- ◆ Sebanyak 0,1 g sampel ditimbang ke dalam *microtube* 1,5 mL
- ◆ Ditambahkan 750  $\mu$ L *compet* extraction buffer dan diinkubasi di dalam *water bath with shaking* pada suhu 37°C selama 30 menit.
- ◆ Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C.
- ◆ Selanjutnya supernatan diambil dan ditambahkan 10  $\mu$ L RNAse 20 mg/mL.
- ◆ Sampel diinkubasi di dalam *water bath with shaking* pada suhu 37°C selama 30 menit lalu dimasukkan ke dalam es selama 5 menit.
- ◆ Kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C.
- ◆ Supernatan ditambahkan 3/4 kali volume isopropanol dingin dan di-*invert*.
- ◆ Sampel diinkubasi di-*freezer* selama 30 menit.
- ◆ Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 25-30 menit, pada suhu 4°C.
- ◆ Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan 500  $\mu$ L etanol 70%.
- ◆ Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
- ◆ Pelet dikering-anginkan lalu dilarutkan dengan TE *buffer* sebanyak 20-50 mL lalu disimpan pada suhu -20°C.

### Elektroforesis:

- ◆ Ditimbang kurang lebih 0,16 g agaros (agar 0,8%) dilarutkan dengan 20 mL TBE 1x.
- ◆ Dipanaskan dalam *microwave* sampai larut dan jernih.
- ◆ Ditambahkan *gel red* sebanyak 1  $\mu$ L.
- ◆ Gel dituang pada *mini-gel electrophoresis system*, ditunggu sampai padat kurang lebih 20 menit.
- ◆ Setelah agar jadi, dengan hati-hati alat pencetak sumurannya diangkat lalu gel dimasukkan pada kotak *running*.
- ◆ Ke dalam kotak *running* ditambahkan TBE 1x sampai menggenangi gel.

- ◆ Sumuran pada gel diletakkan didekat anoda (-) biasanya warna hitam, karena arus listriknya mengalir dari anoda (negatif) ke katoda (positif).
- ◆ *Loading dye* dispot di atas parafilm sebanyak 6 spot 5 untuk sampel dan 2 untuk marker (awal dan akhir), masing-masing 1  $\mu$ L.
- ◆ Sebanyak 3  $\mu$ L sampel diambil kemudian dihomogenkan dengan *loading dye* dengan cara di-*pipeting*, lalu dengan hati-hati dimasukkan ke dalam sumur gel.
- ◆ Sebanyak 1  $\mu$ L marker diambil kemudian dihomogenkan dengan *loading dye* dengan cara di-*pipeting*, lalu dengan hati-hati dimasukkan ke dalam sumur gel.
- ◆ Sampel dielektroforesis pada 50V untuk 60 menit.
- ◆ Dengan menggunakan spatula, gel diangkat kemudian diletakkan di dalam UV transmitter untuk dilihat dan diambil gambarnya.

### Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian dengan Menggunakan *Genequant*:

- ◆ Kuvet yang akan digunakan dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% sehingga tidak terdapat cairan atau gelembung udara.
- ◆ Sebanyak 7  $\mu$ L TE *buffer* dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur dengan menggunakan *genequant*, hasil dibaca pada *display* alat dan dicatat sebagai blanko.
- ◆ Sebanyak 7  $\mu$ L sampel dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan *genequant*, hasil dibaca pada *display* alat.

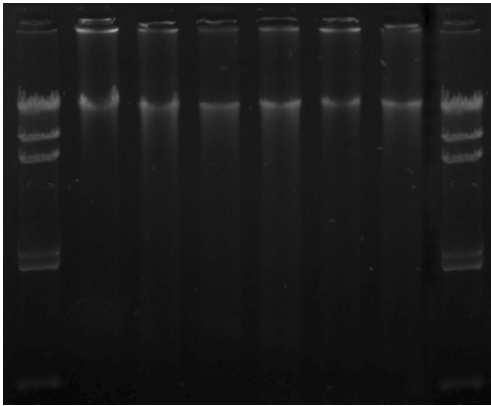
## HASIL DAN BAHASAN

### Ekstraksi DNA

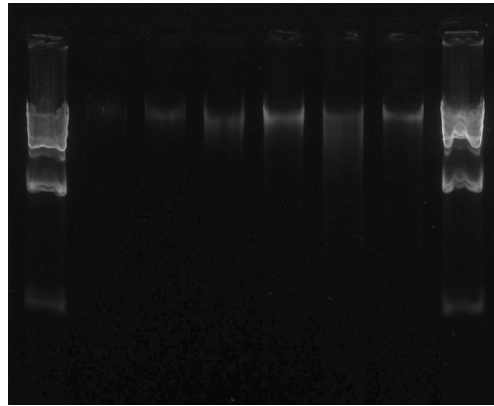
Hasil ekstraksi DNA rumput laut menggunakan metode modifikasi Wattier *et al.* (2000) menghasilkan fragmen tunggal genom yang relatif bersih seperti yang terlihat pada Gambar 1. Hal ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi DNA yang telah dikembangkan untuk tanaman dapat diaplikasikan pada alga khususnya rumput laut *K. alvarezii*.

Metode fenol kloroform menghasilkan pita genom DNA yang relatif bersih. Seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Hasil ekstraksi dengan menggunakan metode Wattier maupun dengan metode fenol



Gambar 1. Genom DNA rumput laut *K. alvarezii* dengan metode modifikasi Wattier



Gambar 2. Genom DNA rumput laut *K. alvarezii* dengan metode fenol kloroform

kloroform memperlihatkan pita genom DNA yang bersih tanpa latar belakang. Hal ini mengindikasikan bahwa tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan adalah baik (DNA tidak terdegradasi dan terkontaminasi). Apabila terjadi kontaminasi oleh senyawa dan bahan organik lainnya dapat dilihat dengan munculnya latar belakang yang *smear* di sepanjang jalur pergerakan pita genom DNA, sedangkan degradasi dan kontaminasi RNA ditandai dengan adanya pita yang kabur pada posisi berat molekul yang rendah.

### Kemurnian DNA

Keberhasilan proses ekstraksi selain ditinjau dari hasil elektroforesis juga dapat diketahui dari hasil pengukuran absorbansi menggunakan *genequant*. Pengukuran dengan

menggunakan *genequant* secara otomatis memberikan informasi kemurnian DNA tanpa melalui perhitungan secara manual. Adapun hasil pengukuran tingkat kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil yang diperoleh didapatkan kemurnian DNA rata-rata 1,81 untuk metode Wattier dan 1,83 untuk metode fenol kloroform. Tingkat kemurnian kedua metode tersebut masuk ke dalam kisaran kemurnian DNA seperti yang disarankan Linacero *et al.* (1998) bahwa kemurnian DNA berada pada kisaran 1,8-2,0. Begitupun menurut Aris (2000), tingkat kemurnian DNA berkisar 1,5-2,1. Bila rasio kurang dari 1,5 maka masih ditemukan adanya kontaminasi senyawa organik atau protein dalam larutan DNA, sedangkan bila rasio lebih dari 2,1 maka terdapat RNA dalam larutan DNA.

Tabel 1. Tingkat kemurnian DNA rumput laut *K. alvarezii* dengan menggunakan metode fenol kloroform dan metode Wattier

Metode modifikasi Wattier		Metode fenol kloroform	
Ulangan	Kemurnian	Ulangan	Kemurnian
1	1,81	1	1,92
2	1,81	2	1,83
3	1,80	3	1,85
4	1,79	4	1,75
5	1,81	5	1,77
6	1,82	6	1,83
<b>Rataan</b>	<b>1,81</b>	<b>Rataan</b>	<b>1,83</b>

### Efektivitas dari Metode

Meskipun kedua metode tersebut memperlihatkan hasil yang relatif sama namun pada metode fenol kloroform menggunakan 14 jenis bahan kimia dan lama kerjanya memakan waktu kurang lebih 6 jam, sedangkan pada metode Wattier hanya menggunakan 9 jenis bahan kimia dengan lama kerja hanya 3,5 jam saja.

### KESIMPULAN

Ekstraksi DNA rumput laut *K. alvarezii* dengan menggunakan metode fenol kloroform walaupun dalam kemurnian dan hasilnya sama dengan metode Wattier namun masih kurang dalam efisiensi karena menggunakan 14 jenis bahan kimia dan lama kerja kurang lebih 6 jam. Sedangkan pada metode Wattier menghasilkan hanya menggunakan 9 jenis bahan kimia dan lama kerja 3,5 jam saja.

### SARAN

Untuk ekstraksi genom DNA rumput laut khususnya rumput laut *K. alvarezii* sebaiknya menggunakan metode Wattier.

### DAFTAR ACUAN

- Angka, S.L. & Suhartono, M.T. 2000. Bioteknologi hasil laut. Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor. Bogor, 47 hlm.
- Aris, M. 2011. *Identifikasi, patogenitas bakteri dan pemanfaatan GEN 16S-rRNA untuk deteksi penyakit Ice-ice pada budidaya rumput laut (Kappaphycus alvarezii)*. Disertasi Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Linacero, J.R. & Vazquez, A.M. 1998. *Quantification of DNA*. Pages 18-21, Isaac G, Ingram DS, editor. *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman and Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., & Rosmiati. 2001. Ekstraksi DNA rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dengan metode fenol kloroform. *Marina Chimica Acta*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin. Makassar, hlm. 6-10.
- Wattier, R.A., Prodohl, P.A., & Maggs, C.A. 2000. DNA Isolation protocol for red seaweed (*Rhodophyta*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28: 275-281.