

TEKNIK PURIFIKASI GENOM Mt-DNA PADA IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*)

Ni Luh Tati Aryani¹⁾ dan Sri Suratmi²⁾

¹⁾ Teknisi Litkayasa Pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

ABSTRAK

Informasi mengenai keragaman genetik dapat diperoleh melalui beberapa cara, di antaranya dengan menganalisis deoxyribonucleic acid mitochondria (mt-DNA). Tujuan dari penulisan makalah ini adalah mengetahui teknik purifikasi DNA untuk mendapatkan genom DNA dengan konsentrasi tinggi. Purifikasi dilakukan apabila genom mt-DNA hasil ekstraksi awal tidak teramplifikasi (tergandakan) dengan PCR oleh karena konsentrasi dan kualitas genom mt-DNA tersebut sangat rendah. Analisis mt-DNA memerlukan genom mt-DNA yang merupakan seperangkat lengkap gen ikan kerapu bebek yang didapatkan dari proses ekstraksi. Dengan teknik purifikasi yang benar menggunakan alat yang steril, serta bahan kimia yang belum kedaluwarsa maka akan diperoleh genom mt-DNA yang berkonsentrasi tinggi dan lebih murni sehingga siap untuk analisis lebih lanjut

KATA KUNCI: PCR (*Polymerase Chain Reaction*), DNA, purifikasi, ikan

PENDAHULUAN

Kualitas benih ikan ditentukan oleh faktor genetik dan lingkungan. Khususnya untuk faktor genetik, maka penggunaan induk yang mempunyai sifat-sifat unggul di antaranya adalah keragaman genetik yang tinggi akan sangat menguntungkan. Sementara itu, faktor lingkungan dapat ditangani dengan cara pemberian pakan yang memadai baik kualitas maupun kuantitasnya serta pengelolaan kualitas air yang terkontrol dengan baik (Susanto, 2002).

Salah satu teknik yang digunakan untuk mengetahui kualitas genetik suatu spesies adalah dengan melakukan analisis mt-DNA (Haryanti *et al.*, 2001; Asmanik, 2003). Informasi mengenai keragaman genetik dapat diperoleh melalui beberapa cara, di antaranya dengan menganalisis deoxyribonucleic acid mitochondria (mt-DNA). Analisis mt-DNA lebih sensitif dibandingkan dengan analisis protein (allozymes) yang sudah banyak dilakukan. mt-DNA merupakan seperangkat lengkap gen dan mempunyai kelebihan sifat di antaranya hanya diturunkan dari induk betina (*maternal inheritance*) sehingga hanya sel telur yang menyumbangkan mt-DNA. Bila induk betina bereproduksi, maka setiap turunannya harus

menerima segugus lengkap data genetik dalam bentuk DNA, termasuk mt-DNA. Dengan demikian tidak akan terjadi perbedaan mt-DNA pada suatu keturunan yang berasal dari induk betina atau tetua betina yang sama.

Untuk mendapatkan genom mt-DNA yang berkonsentrasi tinggi dapat dilakukan dengan proses purifikasi. Purifikasi dilakukan apabila genom mt-DNA hasil ekstraksi awal tidak teramplifikasi (tergandakan) dengan PCR oleh karena konsentrasi dan kualitas genom mt-DNA tersebut sangat rendah.

BAHAN DAN TATA CARA

Teknik purifikasi genom mt-DNA memerlukan beberapa peralatan antara lain: *centrifuge*, *autoclave*, mikro pipet, *ependorf tube* volume 1.500 mL, tip mikro pipet berukuran 5—10 mL, 100 mL, dan 1.000 mL.

Selain peralatan di atas, juga diperlukan beberapa bahan yaitu: Genom DNA hasil ekstraksi awal dengan, 3 M CH₃COONa (pH 5,2), ethanol 95%, ethanol 70% dingin (suhu penyimpanan -20°C) dan larutan penyangga Tris EDTA konsentrasi rendah (*lowTE*).

Tata cara purifikasi genom mt-DNA adalah sebagai berikut:

1. Sebanyak 100 mL genom DNA hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* volume 1.500 mL dengan menggunakan mikropipet.
2. Selanjutnya larutan genom DNA tersebut ditambahkan dengan 10 mL 3M CH₃COONa (pH 5,2) dan dikocok sebentar ± 30 detik. Penambahan 3M CH₃COONa (pH 5,2) bertujuan untuk mempresipitasi (mengikat dan mengendapkan) mt-DNA. Pembuatan larutan 3M CH₃COONa volume 100 mL diperlukan 24,609 g CH₃COONa dilarutkan dengan aquades 100 mL. pH diatur hingga 5,2.
3. Larutan ethanol 95% sebanyak 250 mL juga ditambahkan untuk melarutkan sisa-sisa protein dan divortex sebentar serta didiamkan pada suhu ruangan selama 15 menit.
Campuran larutan dalam tabung *ependorf* disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit, hasil dari sentrifugasi ini akan terlihat cairan/supernatan dan pelet. Untuk pembuatan larutan ethanol 95% sebanyak 1.000 mL, maka diperlukan 950 mL larutan ethanol murni konsentrasi 99,99% kemudian ditambahkan dengan 50 mL aquades steril.
4. Supernatan yang terbentuk tersebut dibuang dengan cara memipet sampai habis dan jangan sampai peletnya ikut terbuang. Selanjutnya larutan ethanol 70% dingin (-20°C) ditambahkan sebanyak 700 mL dan divortex selama ± 30 detik hingga pelet lepas dari penempelan dinding *ependorf tube* tersebut.
Larutan Ethanol 70% sebanyak 1.000 mL dapat disiapkan dari stok ethanol 99,99%. Rumus pembuatan larutan tersebut adalah

- persentase yang dibutuhkan: persentase stok x kebutuhan, sehingga 70: 99,99 x 1.000 = 700 mL. Ambil 700 mL alkohol dengan persentase 99,99% dan ditambah dengan 300 mL aquades steril.
5. Langkah terakhir adalah sentrifugasi larutan tersebut dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan ethanol dibuang dengan cara memipet hingga tidak tersisa dan kering-anginkan selama ± 1 jam.

Setelah pelet mt-DNA kering dilarutkan dengan cara menambahkan 10 mL larutan penyangga TE konsentrasi rendah ke dalam *ependorf tube* tersebut. Larutan penyangga TE konsentrasi rendah (1 mM tris, 0,1 mM EDTA) dibuat dengan cara mencampurkan 1 M Tris pH 8,0 10 mL; 0,25 M EDTA pH 8,0 4 mL; dan 10 mL aquades steril. Larutan tersebut selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C.

Untuk pembuatan larutan 10 mM Tris Cl (pH 8,0) adalah dengan cara menimbang 242,28 mg Tris Cl yang dilarutkan dengan aquades 200 mL dan tepatkan pH-nya menjadi 8,0. Sedangkan untuk menyiapkan larutan 1mM EDTA (pH 8,0) ditimbang 74,45 mg EDTA dan dimasukkan ke dalam larutan 10 mM Tris Cl (pH 8,0), kemudian tepatkan lagi pH-nya menjadi 8,0 dengan cara menambahkan beberapa tetes larutan NaOH dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

6. Genom mt-DNA yang diperoleh kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C dan untuk digunakan pada analisis amplifikasi PCR lebih lanjut.



Gambar 1. Peralatan yang dipergunakan untuk purifikasi DNA: mikropipet (kiri), fortex (tengah), sentrifuge (kanan)



Gambar 2. Alat mesin *gene quant* yang dipergunakan untuk mengetahui konsentrasi DNA sampel

HASIL DAN BAHASAN

Tingkat kemurnian dan konsentrasi genom DNA dari hasil teknik purifikasi dapat diketahui dengan cara mengukur dengan alat *gene quant* dengan cara pengenceran 70x yaitu 1 mL genom dilarutkan dengan 69 mL TE buffer (Gambar 2).

Hasil pengukuran dengan *gene quant* pada beberapa sampel ikan kerapu bebek seperti terlihat pada Tabel 1.

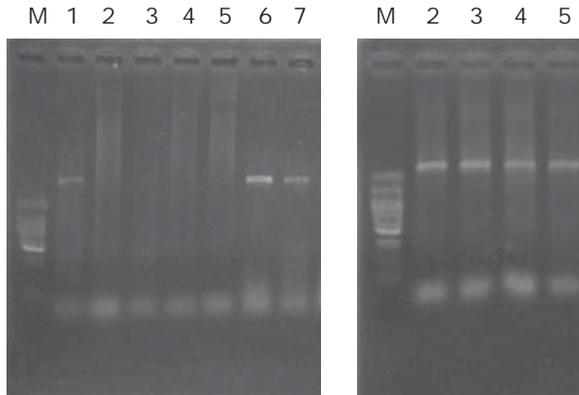
Purifikasi dapat meningkatkan konsentrasi genom mt-DNA. Hal ini terlihat pada Tabel 1 yang menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi genom mt-DNA setelah dilakukan purifikasi. Peningkatan konsentrasi genom mt-DNA tidak selalu sama untuk tiap sampel.

Eksresi fragmen DNA pada gel agarose antara genom hasil ekstraksi awal dengan genom yang sudah dipurifikasi dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 kiri menunjukkan bahwa hasil amplifikasi dari ekstraksi awal yaitu sampel 1, 6, dan 7 menunjukkan sampel yang teramplifikasi sehingga band DNA terekspresikan dan sampel no. 2, 3, 4, dan 5 tidak teramplifikasi yang ditunjukkan dengan tidak terekspresikannya band DNA pada gambar tersebut. Hal tersebut dapat terjadi karena konsentrasi genom DNA sampel no. 2, 3, 4, dan 5 terlalu rendah (Tabel 1) sehingga tidak teramplifikasi dan tidak terekspresikan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan purifikasi terhadap sampel-sampel tersebut yang bertujuan untuk memurnikan dan mening-

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi DNA ikan kerapu bebek dengan menggunakan mesin *gene quant*

Nomor sampel	Konsentrasi DNA (ng)	
	Sebelum purifikasi	Sesudah purifikasi
1	$121,1 \times 70 = 8.477$	$170,8 \times 70 = 11.956$
2	$10,5 \times 70 = 735$	$101,3 \times 70 = 7.091$
3	$15,3 \times 70 = 1.071$	$110,5 \times 70 = 7.735$
4	$12,7 \times 70 = 889$	$113,1 \times 70 = 7.917$
5	$20,1 \times 70 = 1.407$	$120,5 \times 70 = 8.435$
6	$115,1 \times 70 = 8.057$	$165,2 \times 70 = 11.564$
7	$108,2 \times 70 = 7.574$	$169,3 \times 70 = 11.851$



Gambar 3. (Kiri) Hasil amplifikasi dari ekstraksi awal (sampel 1, 6, dan 7 teramplifikasi; sampel 2—5 tidak teramplifikasi). (Kanan) Hasil amplifikasi setelah dipurifikasi (sampel 2—5 teramplifikasi)

katkan konsentrasi genom DNA. Gambar 3b menunjukkan sampel yang sebelumnya tidak teramplifikasi namun setelah dipurifikasi dapat teramplifikasi dan terekspresikan secara sempurna sehingga dapat digunakan dalam proses analisis mt-DNA selanjutnya.

KESIMPULAN

Dengan teknik purifikasi yang benar maka akan didapat genom mt-DNA yang berkonsentrasi tinggi dan lebih murni sehingga siap untuk analisis tahap selanjutnya. Dalam melakukan purifikasi disarankan untuk menggunakan peralatan yang steril dan teknik pipeting yang sempurna.

DAFTAR PUSAKA

- Asmanik. 2003. Kajian variasi genetik udang Api-Api (*Metapenaeus monoceros* Fab.) di perairan Jawa Timur dan Sulawesi Selatan melalui analisa restriction fragment length polymorphism (RFLP) mt-DNA. Tesis Universitas Barawijaya. 54 pp.
- Haryanti, K. Sugama, S.B. Moria, dan I G.N. Permana. 2001. Keragaan mitokondria DNA beberapa mikroalgae sebagai pakan alami larva ikan Bandeng dan Kerapu. Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia Departemen Kelautan dan Perikanan. p. 263--269.
- Susanto, B. 2002. Analisis 16 sr DNA mt-DNA sebagai marka genetik variabilitas pertumbuhan Ikan kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) melalui metode PCR RFLP. Tesis. Universitas Gajah Mada. 54 pp.