

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

TEKNIK ISOLASI DAN ELEKTROFORESIS DNA IKAN TAPAH

Sri Sundari dan Bambang Priadi

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: sri_sundari13@yahoo.co.id

ABSTRAK

DNA mengandung materi genetik yang mengodekan semua informasi yang dibutuhkan untuk proses metabolisme dalam setiap organisme. Isolasi DNA merupakan proses yang sangat penting dalam genetika molekuler dan merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam rekayasa genetika. Tujuan kegiatan ini untuk mengetahui teknik isolasi dan elektroforesis DNA pada ikan Tapah. Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit dengan metode *spin column*. Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan alat spektrofotometer dengan mengukur tingkat kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280. Uji kualitatif dilakukan dengan elektroforesis melalui media gel agarosa. Hasil pengukuran kemurnian DNA berkisar antara 1,67-2,01.

KATA KUNCI: isolasi DNA; elektroforesis; ikan tapah

PENDAHULUAN

Ikan tapah (*Wallago leeri*) merupakan ikan yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi dan bobot maksimalnya bisa mencapai 86 kg dengan panjang 1,5 m (www.fishbase). Ikan tapah digemari masyarakat karena kualitas daging dan rasanya yang enak. Ikan ini mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi dengan harga mencapai Rp120.000,00/kg. Ikan tapah termasuk dalam kelompok *Siluridae*, merupakan jenis ikan yang tahan hidup terhadap kondisi oksigen yang rendah, sering disebut juga sebagai ikan blackfish. Ikan ini tergolong dalam kelompok ikan karnivora, dan merupakan ikan *nocturnal* yang aktif pada malam hari. Ikan tapah merupakan jenis ikan air tawar yang masih tergolong hidup secara liar di alam bebas.

Informasi genetika ikan tapah adalah hal penting untuk mendukung riset mengenai ikan tapah. DNA menjadi salah satu kajian materi dalam biologi molekuler. DNA mengandung materi genetik yang akudes semua informasi yang dibutuhkan untuk proses metabolisme dalam setiap organisme. DNA tersusun atas basa nitrogen, gula, dan fosfat (Yuwono, 2006). Isolasi DNA merupakan langkah yang tepat untuk mempelajari DNA. DNA dapat diisolasi dari sel tanaman, hewan, manusia, maupun bakteri (Fatih, 2009). Isolasi DNA digunakan untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis maupun spektrofotometri. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat.

Melalui isolasi DNA kita dapat memperoleh DNA murni, yaitu tanpa protein maupun RNA dari suatu sel dalam jaringan. Keberhasilan proses isolasi DNA dapat diukur melalui beberapa proses, di antaranya adalah melalui pengecekan keberadaan *band* DNA dengan metode elektroforesis atau melalui pengukuran konsentrasi DNA terlarut dengan metode spektrofotometri (Phillips *et al.*, 2012).

DNA hasil isolasi selanjutnya dilakukan uji kuantitas dan kualitas untuk melihat kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel. Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis horizontal melalui media gel agaros.

Prinsip dasar elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan atau ion melalui medium semi-solid di bawah pengaruh suatu medan listrik. Elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui ukuran DNA dengan menggunakan DNA marker yang sudah diketahui ukurannya. DNA marker ini berfungsi sebagai pembanding sehingga bisa diketahui perkiraan ukuran DNA sampel. Jika molekul yang bermuatan negatif (DNA) dilewatkan melalui gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif, sehingga elektroforesis dapat memisahkan DNA berdasarkan ukuran panjangnya (Yuwono, 2006). Tujuan dari kegiatan ini yaitu untuk mengetahui teknik isolasi dan elektroforesis DNA pada ikan tapah.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan adalah ikan tapah sebanyak 20 ekor. Pengerjaan sampel dilakukan selama bulan Oktober 2018 di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor. Bahan yang digunakan adalah: *DNA kit*, proteinase K, etanol, *TBE Buffer*, *Nucleic acid gel stain*, *agarose*, *loading dye*, *PCR master mix*, dan *marker*.

Alat yang diperlukan adalah: sentrifus, inkubator, mesin PCR, mikropipet, timbangan, *vortex*, pinset, gunting, elektroforesis set, *hot plate*, *stirrer*, spektrofotometer, dan *geldoc*.

Metode

Isolasi DNA

Sampel sebanyak ± 5 mg dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, kemudian ditambahkan 200 μ L *buffer GA*, lalu di-*vortex* selama 15 detik. Setelah itu, ditambahkan 20 μ L proteinase K (20 mg/mL), lalu di-*vortex* dan disentrifus. Kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama satu jam. Setelah disentrifus, ditambahkan 200 μ L *buffer GB*, kemudian di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Setelah disentrifus, ditambahkan 200 μ L etanol (96%-100%), kemudian di-*vortex* dan disentrifus. Larutan dipindahkan ke dalam *tube spin column* yang dilapisi *microtube* baru, kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Kemudian ditambahkan 500 μ L *buffer GD*, lalu disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Setelah itu, ditambahkan 600 μ L *buffer PW* dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Kemudian ditambahkan 600 μ L *buffer PW* dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama dua menit. Setelah itu, *tube spin column* dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL yang baru, kemudian ditambahkan 100 μ L *buffer TE*, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama dua sampai lima menit, kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama dua menit, maka akan diperoleh *template DNA* sampel.

DNA hasil ekstraksi diukur kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer, kemudian dielektroforesis untuk melihat kualitas DNA secara kualitatif.

Elektroforesis

Proses elektroforesis menggunakan gel agarose 1%. Pembuatan gel dilakukan dengan cara menimbang agaros sebanyak 0,3 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 30 mL Tris-Boric

EDTA (TBE) 1x. Dipanaskan sampai larutan menjadi bening, kemudian ditambahkan 3 μ L *nucleic acid gel stain*, selanjutnya dicetak pada pencetak gel menggunakan sisir pembentuk sumur gel. Elektroforesis dijalankan pada voltase 100 volt selama ± 30 menit. Visualisasi pita DNA hasil elektroforesis dilakukan dengan *geldoc*.

HASIL DAN BAHASAN

Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Dolphin, 2008). Proses isolasi DNA dilakukan dengan metode *spin column* yaitu dengan penggunaan membran silika untuk memerangkap DNA yang telah keluar dari sel. Selain itu, penggunaan kit dengan *reagen* khusus yang biasanya digunakan dalam metode ini mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan. Chan *et al.* (2001) menyebutkan bahwa metode *spin column* merupakan metode yang paling efisien dalam penggunaannya, bahkan dapat digunakan untuk mengekstrak sampel dalam bentuk sampel yang telah dipreservasi dalam parafin, contohnya adalah sampel *human papilloma virus* (HPV).

Reaksi enzimatik dari proteinase K yang digunakan dalam metode ini mampu melisiskan DNA dari dalam selnya, sehingga mempermudah proses ekstraksi DNA. Penggunaan *reagen* khusus untuk mengikat dan membersihkan sisa alkohol dan pengotor lainnya, seperti beberapa enzim inhibitor, protein, dan kation bivalen yang masih tersisa dari proses preservasi sampel. Proses pembilasan yang lebih dari sekali dengan menggunakan reagen khusus, dan proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi (12.000 rpm) yang diterapkan dalam metode tersebut, mampu menghasilkan ekstrak DNA yang lebih bersih, lebih murni, dan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Dengan demikian, ekstrak DNA yang dihasilkan diharapkan mampu mendukung kesuksesan proses selanjutnya (amplifikasi DNA dan sequencing DNA).

Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ($A_{260/280}$) pada alat spektrofotometer. Hasil pengukuran *template DNA* ikan tapah menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengukuran kuantitas DNA diperoleh kemurnian dengan nilai 1,67-2,01. Menurut Sambrook *et al.* (1989), hasil ekstraksi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8-2,0. Dari Tabel 1, terlihat masih ada nilai di bawah 1,8; hal ini menunjukkan dalam DNA tersebut masih terdapat sedikit pengotor, hal ini dapat disebabkan karena kesalahan pada saat pengerjaan atau tingkat kualitas sampel.

Tabel 1. Nilai kemurnian DNA ikan tapah

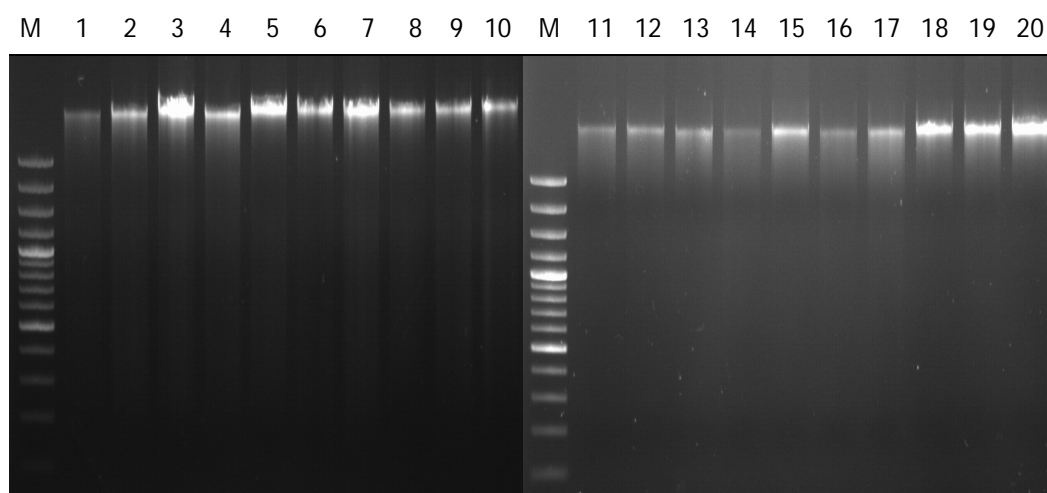
Nomor sampel	Kemurnian DNA ($A_{260/280}$)
1	1.84
2	1.82
3	1.67
4	1.82
5	1.68
6	1.70
7	1.67
8	1.80
9	1.81
10	1.80
11	1.88
12	2.00
13	1.87
14	1.81
15	2.01
16	2.00
17	1.98
18	1.79
19	1.80
20	1.77

Molekul DNA yang telah diisolasi diuji kualitasnya melalui elektroforesis. Sebelum proses elektroforesis, suspensi DNA dicampur dengan pewarna muatan berwarna (*loading dye*). Penambahan pewarna ini berfungsi untuk menambah densitas sehingga DNA berada di bagian bawah sumur; selain itu, pewarna ini digunakan untuk memudahkan meletakkan DNA ke dalam sumur dan menandai migrasi DNA.

Secara kualitatif, hasil isolasi DNA ikan tapah dapat dilihat melalui hasil visualisasi elektroforesis pada

Gambar 1. Molekul DNA yang bagus adalah DNA yang menunjukkan pita tebal, tegas, dan tidak terdapat *smear*. *Smear* dalam hal ini disebabkan DNA mengalami degradasi atau DNA terfragmentasi (tidak utuh). Dengan demikian, semakin tebal, tegas, dan utuh DNA yang diperoleh akan membuat kuantitas dari DNA semakin bagus.

Berdasarkan hasil pada Gambar 1, terdapat *smear* pada beberapa pita DNA yang menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh belum murni atau masih terdapat zat-



Gambar 1. Hasil visualisasi elektroforesis *template* DNA ikan tapah (M = marker).

zat lain yang ikut tercampur. *Smear* terbentuk akibat degradasi DNA menjadi potongan-potongan pendek. Hal ini dapat terjadi karena perlakuan DNA selama isolasi. *Smear* juga dapat disebabkan oleh volume DNA yang terlalu banyak saat elektroforesis atau penggunaan tegangan yang terlalu besar (Ausubel, 1990). Fragmen DNA yang tipis pada gel agaros dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti rendahnya konsentrasi DNA.

KESIMPULAN

Isolasi DNA dapat dilakukan dengan kit menggunakan metode *spin column*. Proses elektroforesis dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA secara kualitatif. Hasil pengukuran kemurnian DNA berkisar antara 1,67-2,01.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Nurhidayat, M.Si. selaku Plt. Kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyulhan Perikanan

Bogor, Dr. Anang Hari Kristanto, selaku ketua kelompok peneliti genetika populasi dan *breeding*, serta seluruh peneliti dan teknisi litkayasa atas bantuan dan kerja samanya.

DAFTAR ACUAN

- Chan, P., Chan, D., To, K., Yu, M., Cheung, J., & Cheng, A. (2001). Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 401-403.
- Fatih, M. (2009). Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10(1), 61-67.
- Phillips, K., McCallum, N., & Welch, L. (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA investigator kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 282-285
- Yuwono, T. (2006). Biologi molekuler. Jakarta: Erlangga.