

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

PERBANDINGAN TIGA METODE EKSTRAKSI DNA UNTUK ANALISA PCR IKAN BAUNG (*Hemibagrus nemurus*)

Sri Sundari, Bambang Priadi, dan Sudarmaji

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129
E-mail: sri_sundari13@yahoo.co.id

ABSTRAK

Molekul DNA dalam suatu sel dapat diekstraksi untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis. Tujuan kegiatan ini untuk mengetahui efektivitas dalam memperoleh kemurnian DNA serta efisiensi waktu pengerjaan dari berbagai metode ekstraksi yang dilakukan yaitu metode phenol, menggunakan *kit*, dan metode *alkaline lysis*. Parameter yang digunakan adalah tingkat kemurnian DNA, hasil elektroforesis DNA dan amplifikasi sampel. Primer yang digunakan untuk PCR adalah OPA 18. Hasil yang diperoleh adalah metode *kit* menghasilkan tingkat kemurnian DNA tertinggi yaitu 1,82-2,02; namun dari segi waktu, pengerjaan dan biaya, metode ekstraksi DNA dengan *alkaline lysis* menunjukkan hasil yang paling efektif dan efisien.

KATA KUNCI: ekstraksi DNA; analisa PCR; ikan baung

PENDAHULUAN

Ikan baung (*Hemibagrus nemurus*) termasuk kelompok catfish bernilai ekonomis tinggi yang populer di Asia dengan nama "*Asian redtail catfish*". Ikan ini sudah mulai dikembangkan budidayanya. Namun, salah satu kendalanya adalah ketersediaan benih, khususnya terkait rendahnya fekunditas, daya tetas telur, dan sintasan dari larva hingga ukuran benih.

Kajian genetik merupakan salah satu usaha dalam mendapatkan informasi yang diharapkan dapat meningkatkan efisiensi budidaya ikan baung. Salah satunya adalah dengan mengkaji variasi genetik ikan baung. Menurut Dunham (2004), variasi genetik penting untuk sintasan jangka panjang suatu spesies atau populasi tersebut terutama untuk beradaptasi pada perubahan lingkungan. Variasi genetik sangat penting dalam suatu populasi ikan untuk mendapatkan varietas yang unggul.

Keragaman genetik menjadi penting karena perbaikan mutu genetik didasari oleh keragaman genetik yang dimiliki oleh suatu populasi. Penentuan variasi genetik pada ikan dapat dilakukan berdasarkan karakter morfologi dan genotipenya. Variasi genotipe dapat dilakukan melalui pendekatan molekuler yang melibatkan asam nukleat (DNA).

Analisis tingkat molekuler dengan DNA sebagai objeknya diawali dengan proses ekstraksi DNA untuk

mendapatkan DNA yang murni dengan konsentrasi tinggi sehingga dapat digunakan untuk analisis molekuler selanjutnya seperti PCR, RFLP, dan RAPD (Mulyani *et al.*, 2011).

Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik konvensional maupun menggunakan *kit*. Ekstraksi DNA secara konvensional bisa dilakukan antara lain dengan metode *Phenol-Chloroform* (Nugroho *et al.*, 1997), metode CTAB/NaCl (Mulyani *et al.*, 2011), dan metode *alkaline lysis* menggunakan NaOH dan Tris-HCl. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, ekstraksi DNA dapat dilakukan menggunakan *kit* dari berbagai merk, dalam kegiatan ini menggunakan *TIANamp Marine Animals DNA Kit* (Tiangen).

Beberapa metode tersebut merupakan metode umum yang digunakan untuk ekstraksi DNA ikan. Oleh karena itu, di dalam penelitian ini beberapa metode tersebut diuji tingkat efektivitasnya dalam mengekstraksi DNA untuk mendapatkan hasil yang terbaik secara kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan serta efisiensi waktu dalam proses pengerjaannya, untuk selanjutnya digunakan dalam analisa PCR ikan baung. Tujuan dari kegiatan ini yaitu untuk membandingkan metode ekstraksi DNA yang terbaik untuk analisa PCR pada ikan baung.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan adalah ikan baung sebanyak 10 ekor. Pengerjaan sampel dilakukan selama bulan September 2017 di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor. Bahan yang digunakan adalah: *TIANamp Marine Animals DNA Kit* (Tiangen), TNES Urea, Proteinase K, Natrium asetat, NaOH, Tris-HCl, etanol, *Phenol Chloroform Isoamylalcohol*, *TBE Buffer*, *TE Buffer*, primer OPA 18, *Nucleic acid gel stain*, *KOD FX Neo Toyobo*, *agarose*, *loading dye*, dan *marker*.

Alat yang diperlukan adalah sebagai berikut: sentrifus, inkubator, mesin PCR, mikropipet, timbangan, vortex, pinset, gunting, elektroforesis mupid-2, *hot plate*, *stirrer*, spektrofotometer, dan *geldoc*.

Metode

Metode Ekstraksi DNA yang dilakukan:

- Metode *Phenol-Chloroform* (Nugroho *et al.*, 1997)

Sampel sebanyak ± 5 mg dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL yang telah berisi 500 μ L larutan TNES Urea, kemudian ditambahkan 10 μ L proteinase K lalu divortex sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan larutan *Phenol Chloroform Isoamylalcohol* sebanyak 1.000 μ L lalu divortex sampai homogen dan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru, kemudian ditambahkan 1.000 μ L larutan *ethanol* 90% dan 10 μ L larutan natrium asetat. Setelah divortex, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan DNA dipisahkan dari larutan dan dikeringkan pada suhu ruang, template DNA dilarutkan dalam 50 μ L *Tris-EDTA* (TE) *buffer*.

- Metode *TIANamp Marine Animals DNA Kit* (Tiangen)

Sampel sebanyak ± 5 mg dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, kemudian ditambahkan 200 μ L buffer GA, lalu divortex selama 15 detik. Setelah itu ditambahkan 20 μ L proteinase K (20 mg/mL), lalu divortex dan disentrifus. Kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama satu jam. Setelah disentrifus, ditambahkan 200 μ L buffer GB, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Setelah disentrifus, ditambahkan 200 μ L etanol (96-100%), kemudian divortex 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 disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama dua menit, maka akan diperoleh template DNA sampel.

- Metode *Alkaline lysis*

Sampel sebanyak ± 5 mg dimasukkan ke dalam *microtube* 0,6 mL; kemudian ditambahkan 180 μ L NaOH 50 mM lalu divortex. Setelah itu diinkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 20 μ L Tris-HCl 1 M, lalu divortex dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama lima menit.

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

Analisa DNA dengan PCR

Analisa DNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi bahan sebagai berikut: 2 μ L DNA, 1 μ L primer OPA 18 (urutan basa AGGTGACCGT), 12,5 μ L PCR buffer, 5 μ L dNTPs, 0,5 μ L KOD FX Neo Toyobo dan 4 μ L aquadest. Setelah itu dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, 40 siklus penggandaan yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* (penempelan primer) pada suhu 36°C selama satu menit dan *extension* (pemanjangan) pada suhu 72°C selama 2 menit. Pada tahap terakhir pemanjangan pada suhu 72°C dilakukan selama tujuh menit dan dilanjutkan dengan inkubasi pada 4°C selama tiga menit.

Elektroforesis

Proses elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%. Elektroforesis dijalankan pada voltase 100 volt selama ± 40 menit. Sebagai pembanding, digunakan DNA *ladder* 100 bp plus sebagai marker ukuran pita DNA. Visualisasi pita DNA hasil elektroforesis dilakukan dengan *geldoc*.

HASIL DAN BAHASAN

Beberapa metode ekstraksi DNA yang dilakukan pada kegiatan ini memungkinkan hasil ekstrak DNA

yang berbeda. Hal ini tergantung pada efektivitas metode tersebut dalam menghasilkan *template* DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya serta efisiensi waktu pengerjaan. Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksanaan untuk mendapatkan data, baik tekniknya maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, ketersediaan sumber daya manusia, fasilitas, dan dana (Ardiana, 2009).

Hasil pengukuran *template* DNA ikan baung menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 1.

Secara kualitatif, hasil ekstraksi DNA ikan baung dapat dilihat melalui elektroforesis (Gambar 1).

Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ($A_{260/280}$). Metode ekstraksi DNA dengan phenol menghasilkan tingkat kemurnian antara 1,10-1,31. Larutan TNES-Urea merupakan buffer lisis yang berperan memecah membran sel. Penambahan

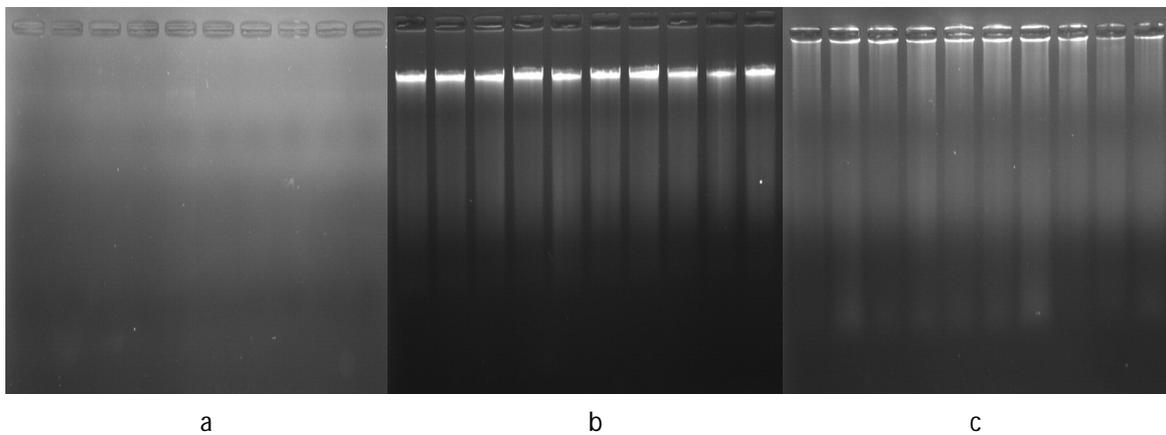
phenol berfungsi untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang dapat mengkontaminasi DNA. Hasil ekstraksi DNA dengan metode phenol secara kualitatif dapat dilihat pada Gambar 1a, dan menunjukkan kenampakan band genom yang tipis, hal ini menunjukkan masih adanya pengotor.

Metode ekstraksi DNA dengan kit (tiangen) menghasilkan tingkat kemurnian yang paling tinggi yaitu antara 1,82-2,02. Menurut Sambrook *et al.* (1989), hasil ekstraksi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8-2,0. Hasil visualisasi *template* DNA metode kit ditunjukkan pada Gambar 1b, berupa band yang tebal dan bersih, hal ini menunjukkan tingginya tingkat kemurnian *template* DNA. Metode kit sudah teruji hasilnya dalam mengekstrak DNA baik secara kuantitas maupun kualitas. Namun, metode ini membutuhkan biaya yang cukup besar.

Metode ekstraksi DNA dengan alkaline lysis menghasilkan tingkat kemurnian antara 1,25-1,34.

Tabel 1. Nilai kemurnian DNA ikan baung

Nomor sampel	Kemurnian DNA ($A_{260/280}$)		
	Metode phenol	Metode kit (Tiangen)	Metode alkaline lysis
1	1,21	1,94	1,29
2	1,20	1,95	1,34
3	1,31	1,90	1,26
4	1,10	1,84	1,34
5	1,30	2,00	1,33
6	1,20	1,90	1,28
7	1,21	2,00	1,34
8	1,20	1,82	1,25
9	1,10	2,02	1,28
10	1,10	1,86	1,32



Gambar 1. Hasil visualisasi elektroforesis *template* DNA ikan Baung dengan metode: a= phenol, b= kit (tiangen), c= alkaline lysis.

Penambahan NaOH dan penggunaan suhu tinggi (95°C) bertujuan untuk memaksimalkan pemecahan sel. Penambahan Tris-HCl untuk mendenaturasi protein. Penampakan *smear* pada Gambar 1c, menunjukkan adanya pengotor dalam template DNA yang dihasilkan.

Menurut Ausubel (2003), ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses ekstraksi DNA antara lain harus menghasilkan DNA tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA, metodenya harus efektif dan bisa dilakukan untuk semua spesies metode yang dilakukan tidak boleh mengubah struktur dan fungsi molekul DNA, dan metodenya harus sederhana dan cepat.

Untuk melihat lebih jauh terhadap kualitas hasil ekstraksi DNA, maka dilakukan amplifikasi DNA melalui analisa PCR ikan baung menggunakan primer OPA 18 (Gambar 2).

Secara kualitatif, hasil analisa PCR dari DNA dengan metode ekstraksi phenol, kit, dan *alkaline lysis* tidak berbeda nyata. Hal ini dapat dilihat dari seluruh sampel ikan baung yang teramplifikasi dan menghasilkan gambaran band yang cukup jelas, dengan ukuran antara 300-2.500 bp.

KESIMPULAN

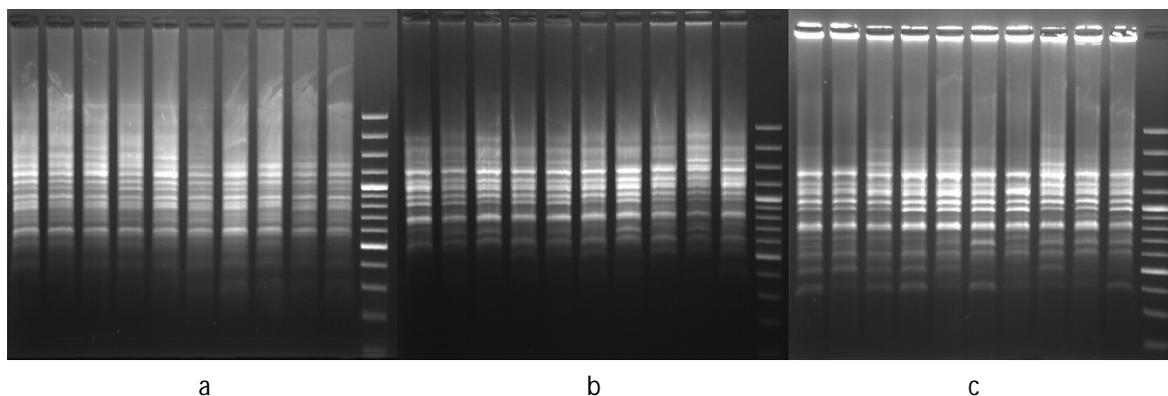
Metode ekstraksi dengan *Phenol-Chloroform* menghasilkan nilai kemurnian DNA 1,10-1,30 dengan biaya terjangkau, metode *TIANamp Marine Animals DNA Kit* menghasilkan nilai 1,82-2,02 dengan biaya yang cukup mahal dan metode *Alkaline lysis* menghasilkan nilai 1,25-1,34 dengan biaya terjangkau. Selain nilai kemurnian DNA perlu diperhatikan pula hasil elektroforesis DNA dan PCR sampel, dengan demikian metode yang efektif dan efisien dari segi waktu, pengerjaan dan biaya adalah metode ekstraksi DNA dengan *Alkaline lysis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Brata Pantjara, M.P. selaku Kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor, Ir. Anang Hari Kristanto, M.Sc., Ph.D. selaku ketua kelompok peneliti genetika populasi dan breeding, serta seluruh peneliti dan teknisi litkayasa atas bantuan dan kerjasamanya.

DAFTAR ACUAN

- Ardiana, D.W. (2009). Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian*, 14(1), 12-16.
- Ausubel, F.M. (2003). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (Eds.), pp. 213-217. *Current Protocols in Molecular Biology*. Cambridge: John Wiley & Sons, Inc.
- Dunham, R.A. (2004). Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic approach. CABI Publishing Cambridge, USA, p. 85-99.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nuruhwati, I. (2011). Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini *Koi Herper Virus* (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 8(11), 1-16.
- Nugroho, E., Takagi, M., & Taniguchi, N. (1997). Practical manual on detection of dna polymorphism in fish population study. *Bulletin of Marine Science and Fisheries*, 17, 109-130.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. & Miniatis, T. (1989). *Moleculer cloning*. Cold Spring Harbor Press. University of Texas South Western Medical Centre, Texas.



Gambar 2. Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan baung dengan primer OPA 18 menggunakan metode ekstraksi: a= phenol, b= kit (tiangen), c= alkaline lysis