

PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI DNA *PHENOL-CHLOROFORM* DAN *KIT EXTRACTION* PADA SAPI ACEH DAN SAPI MADURA

Kamaliah

Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry Banda Aceh,
Email: dyahelmy@gmail.com

ABSTRAK

Ekstraksi DNA merupakan tahap pertama penelitian molekular yang sangat berpengaruh terhadap kualitas isolasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan ekstraksi DNA menggunakan metode *Phenol-Chloroform* dan *KIT Extraction*. Visualisasi hasil isolasi DNA menggunakan teknik elektroforesis setelah gen leptin sapi Aceh dan sapi Madura diamplifikasi secara *in vitro* (*Polymerase Chain Reaction*). Tidak ada teknik ekstraksi DNA yang memberikan keunggulan secara keseluruhan. Metode ekstraksi *Phenol-Chloroform* memberikan keunggulan terhadap harga yang lebih murah, lebih sensitif dalam isolasi DNA, dan menghasilkan pita DNA yang jelas. Keunggulan *KIT Extraction* lebih mudah, cepat, dan DNA yang dihasilkan lebih tebal.

Kata Kunci: Metode Ekstraksi DNA, Metode *Phenol-Chloroform*, PCR

ABSTRACT

DNA extract is the first phase of molecular research which really influences the quality of DNA isolate. The aim of this study was to find out the comparison of DNA extract by using *Phenol-Chloroform* and *KIT extraction*. The visualization of DNA isolate resulted from electrophoresis technique after leptin gen of Aceh's cow and Madura's cow were amplified through *in vitro* (*Polymerase Chain Reaction*). There were not any techniques of DNA extraction which can provide excellence results as a whole. *Phenol-Chloroform* extraction method gives advantage for lower price, more sensitive in isolating DNA, and clear DNA ribbon. Meanwhile, *KIT extraction* method is easier, fast, and thick DNA produced.

Keywords: DNA extraction method, *Phenol-Chloroform* method, *KIT extraction*

PENDAHULUAN

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik paling akurat untuk identifikasi spesies, identifikasi hubungan kekerabatan spesies secara evolusi genetik, identifikasi DNA forensik, deteksi fungi, virus atau bakteri dalam medis, pengujian kualitas air, dan sebagainya [1,2,3,4,5]. Tingkat keberhasilan teknik PCR ditentukan oleh metode ekstraksi DNA yang digunakan [6]. Pelet DNA yang mengandung polisakarida dari hasil ekstraksi dapat menghambat aktivitas kerja enzim Taq Polimerase [7]. Selain itu, kontaminan lainnya seperti polifenol teroksidasi dapat mengikat DNA dalam bentuk ikatan kovalen [8].

Tahapan ekstraksi DNA terdiri dari tiga proses utama, yaitu proses lisis sel, purifikasi,

dan presipitasi. Proses lisis sel merupakan proses pertama ekstraksi DNA diawali dengan menghancurkan membran sel dengan cara memberikan enzim Proteinase K untuk merusak protein dan Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) untuk mengikat lipid sehingga membran sel rusak dan semua isi sel keluar. Proses lisis sel menyebabkan DNA bercampur dengan makromolekul sel lainnya. Pemurnian DNA dari makromolekul sel dilakukan pada tahap purifikasi dengan cara memberikan *Phenol* dan CIAA (*Chloroform Isoamil Alkohol*) untuk mengikat makromolekul selain DNA seperti protein, lipid, dan karbohidrat. Pada tahap ini DNA dan air terpisah dari bahan organik lainnya setelah disentrifugasi. Untuk menarik air dari DNA dibutuhkan alkohol. Proses ini disebut

dengan presipitasi. Metode ekstraksi DNA tersebut merupakan metode Fenol-Chloroform yang umum digunakan didalam prosedur laboratorium [9]. Sejalan dengan berkembangnya teknologi metode ekstraksi DNA diciptakan seefisien mungkin untuk memudahkan kegiatan ekstraksi DNA. Salah satu produk ekstraksi yang digunakan adalah *KIT Extraction*. Tahapan *KIT Extraction* mengikuti prosedur dari perusahaan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2011 di bagian Fungsi Hayati dan Prilaku Hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel darah sapi Madura berasal dari koleksi Laboratorium Bagian Fungsi Hayati dan Perilaku Hewan Departemen Biologi FMIPA IPB sebanyak 6 sampel. Sampel darah sapi Aceh berasal dari Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Indrapuri Aceh besar sebanyak 3 sampel.

Metode Ekstraksi *Phenol-Chloroform*

Sampel darah di dalam alkohol absolut dicuci dengan air destilata steril sebelum dilakukan ekstraksi. Kemudian sampel darah diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Sampel darah yang diambil untuk ekstraksi DNA adalah sebanyak 100 µl.

Pada proses lisis endapan sampel darah 100 µl dilarutkan dalam larutan STE (Salt Tris EDTA) hingga 1 ml. Proteinase K digunakan sebanyak 10 µl dan diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 1 jam. Selanjutnya ditambahkan SDS (Sodium Dodecyl Sulfat). Purifikasi DNA digunakan *Phenol* 1 ml dan CIAA (*Chloroform* Isoamil Alkohol) 1 ml. Perbandingan volume *Phenol* : *Chloroform* : Isomilalkohol adalah 25:24:1. Kemudian ditambahkan larutan NaCl 5 M sebanyak 100 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit. Proses presipitasi menggunakan alkohol absolut 2 x volum awal dan NaCl 5 M 1/10 volume awal. Pada tahapan presipitasi DNA diendapkan dengan sentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit.

Sapi Aceh dan sapi madura merupakan hewan ternak penghasil daging yang sedang diupayakan oleh pemerintah. Penelitian marka genetik sapi Aceh dan sapi Madura semakin berkembang. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan ekstraksi DNA menggunakan metode ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dan *KIT Extraction* pada sapi Aceh dan sapi Madura.

Tahap pencucian etanol dan sisa garam menggunakan etanol 70% sebanyak 1 ml. DNA diendapkan dengan sentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Etanol diuapkan dalam ruang vakum sehingga diperoleh endapan pelet DNA murni. Pengenceran DNA menggunakan aquadest sebanyak 100 µl.

Metode Ekstraksi *Genomic DNA Mini Kit for Blood (Geneaid)*

Ekstraksi *Genomic DNA Mini Kit for Blood (Geneaid)* yang digunakan dimodifikasi pada tahap pencucian sampel darah dari alkohol dan tahap resuspensi yang menggunakan air destilata steril. Endapan sel darah sebanyak 200 µl dilisis menggunakan larutan *GB buffer* sebanyak 200 µl, kemudian diinkubasi pada suhu 35⁰C selama 10 menit. Selanjutnya DNA diikat pada matriks di dalam tabung. Tahap pengikatan DNA pada matriks bertujuan untuk memisahkan DNA dari makromolekul sel lainnya. DNA terikat pada matriks, sedangkan makromolekul sel lainnya mengendap pada bagian dasar tabung. DNA pada matriks dicuci menggunakan larutan 400 µl *W1 buffer* dan 600 µl *Wash buffer*. Selanjutnya DNA diencerkan menggunakan larutan *Elution buffer* sebanyak 100 µl.

Amplifikasi

Pengujian hasil ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Amplifikasi menggunakan mesin PCR ESCO *Swift Maxi Thermal Cycler*. Gen yang diamplifikasi adalah gen leptin daerah ekson 2. Panjang daerah ekson 2 yang diapit oleh sepasang primer sebesar 234 pb. Pasangan primer yang digunakan primer *forward* dengan urutan nukleotida L5 (5'-CCATGGCAGACAGCAAATCTCGT-3') dan *reverse* dengan urutan nukleotida L6 (5'-

TGGTGCATCCTGGACCTTCC-3') [10]. Volume total reaksi amplifikasi sebanyak 25 µl terdiri atas 12,5 µl 1 unit KAPA2G Robust Hotstart ReadyMix (MgCl₂ 2mM dan masing-masing dNTP 0,2 mM), masing-masing primer 0,5 µM 1,25 µl, dan genom DNA 10 ng. Kondisi PCR yang digunakan untuk amplifikasi daerah ekson 2 terdiri atas tahap pradenaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit. Tahap selanjutnya 30 siklus dengan kondisi denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 15 detik, dan elongasi pada

suhu 72°C selama 15 detik. Elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

Visualisasi Produk Amplifikasi

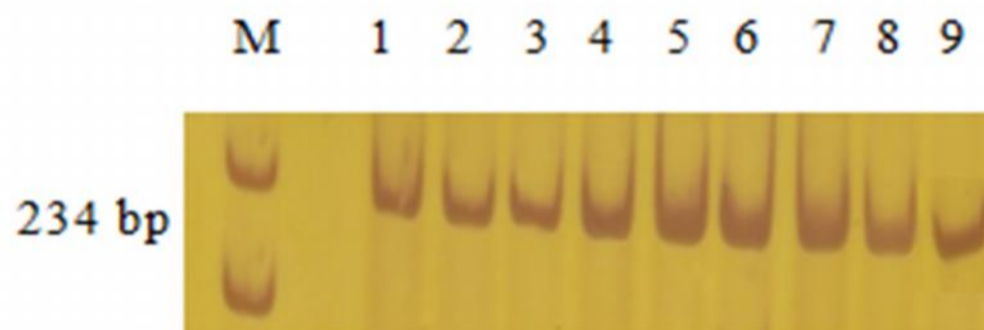
Produk amplifikasi gen leptin daerah ekson 2 dimigrasikan menggunakan teknik Elektroforesis Gel Poliakrilamid (PAGE 6%) dengan konsentrasi bufer 1 TBE (Tris-HCl 0,5; Asam Borat 0,65; EDTA 0,02 M). Visualisasi DNA menggunakan pewarnaan perak berdasarkan Byun *et al.* (2009) [11].

HASIL DAN PEMBAHASAN

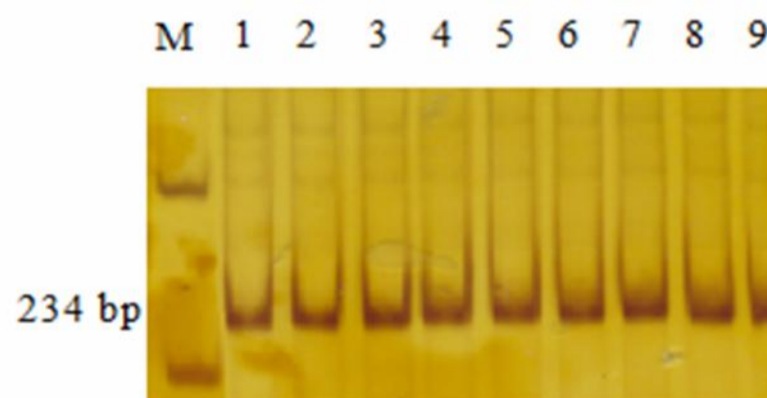
Amplifikasi Gen Leptin dari Hasil Ekstraksi

Perbandingan metode ekstraksi DNA menggunakan metode ekstraksi *Phenol-Chloroform* dan metode ekstraksi KIT setelah di amplifikasi menunjukkan pita DNA yang jelas. Amplifikasi menggunakan gen leptin menunjukkan ukuran pita DNA sebesar 234 bp. Visualisasi DNA pada metode *Phenol-Chloroform* menunjukkan pita DNA tunggal,

tidak terlihat kontaminan, dan ukuran DNA lebih tipis (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan metode *Phenol-Chloroform* lebih cocok digunakan untuk pemetaan genetik, teknologi marker, dan DNA *sequencing* [12]. Metode *KIT Extraction* memperlihatkan sedikit kontaminan dan semua sampel pada *KIT Extraction* menunjukkan ukuran pita DNA yang tebal (Gambar 2).



Gambar 1. Produk Amplifikasi Gen Leptin Menggunakan Metode Ekstraksi *Phenol-Chloroform*. M:Penanda, 1:Sapi Aceh (Kml_BosA11), 2:Sapi Aceh (Kml_BosA12), 3:Sapi Aceh(Kml_BosA13), 4:Sapi Madura (AF14), 5:Sapi Madura (AF26), 6:Sapi Madura (AF38), 7:Sapi Madura (AF32), 8:Sapi Madura (AF41), 9:Sapi Madura (AF29).



Gambar 2. Produk Amplifikasi Gen Leptin Menggunakan Metode *KIT Extraction*. M:Penanda, 1:Sapi Aceh (Kml_BosA11), 2:Sapi Aceh (Kml_BosA12), 3:Sapi Aceh(Kml_BosA13), 4:Sapi Madura (AF14), 5:Sapi Madura (AF26), 6:Sapi Madura (AF38), 7:Sapi Madura (AF32), 8:Sapi Madura (AF41), 9: Sapi Madura (AF29).

Perbedaan Reagent dan Prosedur

Reagent yang digunakan pada setiap tahapan metode ekstraksi *Phenol-Chloroform*

dan *KIT Extraction* menunjukkan perbedaan. Metode ekstraksi *Phenol-Chloroform* secara umum terdiri atas tiga tahap, yaitu proses lisis

sel, purifikasi, dan presipitasi. Proses lisis sel menggunakan SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) untuk mengikat protein dan lemak pada membran sel sehingga membran sel terbuka dan semua isi sel keluar [13]. Selain itu proses lisis sel menggunakan enzim Proteinase K berperan untuk menghancurkan protein [14]. Pada proses lisis endapan sampel dilarutkan dalam larutan STE (Salt Tris EDTA). STE berfungsi sebagai buffer untuk mencegah kerusakan DNA dengan mempertahankan pH dalam keadaan normal, yaitu pH=8 [15]. Tahap purifikasi bertujuan untuk memurnikan DNA dari makromolekul sel lainnya setelah sel dihancurkan. Metode ekstraksi *Phenol-Chloroform* menggunakan larutan Fenol dan CIAA (Chloroform Isoamil Alkohol) untuk mengikat protein, lipid, dan karbohidrat [9]. Selain itu pada tahap purifikasi digunakan larutan NaCl jenuh untuk memekatkan DNA [12]. Pemisahan DNA dan makromolekul sel lainnya terpisah setelah disentrifugasi. Makromolekul protein dan polisakarida yang diikat oleh *Phenol* dan CIAA (*Chloroform* Isoamil Alkohol) mengendap di dasar tabung, sedangkan DNA dan air berada di lapisan atas [16]. DNA yang diperoleh masih terlarut di dalam air sehingga dalam metode ekstraksi ini digunakan alkohol absolut pada proses presipitasi. Tahap Pencucian etanol dan sisa garam dari endapan DNA dilakukan dengan sentrifugasi dan vakum untuk memurnikan DNA. Etanol diuapkan dalam ruang vakum sehingga diperoleh endapan pelet DNA murni. Pelet DNA berupa endapan kering sehingga pada metode ini menggunakan

aquadest untuk pengenceran DNA. Pada *KIT Extraction* bahan yang digunakan telah dirancang untuk memudahkan dalam melakukan isolasi DNA. Selain itu, fasilitas pengikatan DNA dirancang dalam suatu tabung yang memiliki matriks sebagai tempat pengikatan DNA. Matriks terlindungi di dalam tabung sehingga tidak mudah rusak.

Ekstraksi DNA menggunakan metode *KIT Extraction* lebih singkat jika dibandingkan dengan metode *Phenol-Chloroform*. Total waktu yang dibutuhkan pada metode *KIT Extraction* sekitar 35 menit, sedangkan metode ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* membutuhkan waktu sekitar 2 jam 47 menit (Tabel 1). Metode *Phenol-Chloroform* merupakan metode yang lebih sensitif jika dibandingkan dengan *KIT Extraction* sehingga membutuhkan ketelitian dalam melakukan ekstraksi DNA atau dalam mempersiapkan larutan yang dibutuhkan [17]. Larutan *Phenol* dan *Chloroform*-Isoamil Alkohol perlu dipersiapkan sebelum ekstraksi DNA dilakukan. *Phenol*, *Chloroform*, dan Isoamil alkohol merupakan larutan yang mudah mengalami oksidasi. Selain itu, *Phenol* merupakan senyawa yang bersifat toksik. Perbandingan biaya yang dikeluarkan pada saat melakukan ekstraksi DNA metode *Phenol-Chloroform* memerlukan biaya yang lebih murah jika dibandingkan dengan *KIT Extraction* [17].

Tabel 1. Reagent dan Total Waktu pada Metode Ekstraksi *Phenol-Chloroform* dan *KIT Extraction*

Metode Isolasi	Reagent	Total Waktu Yang Dibutuhkan
Fenol-Chloroform	SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) Fenol, CIAA, NaCl Etanol, NaCl	2 jam 47 menit
<i>KIT Extraction</i>	GB Buffer Etanol, Matriks GD Coloum W1 Buffer, Wash buffer, Elution Buffer	35 menit

KESIMPULAN

Ekstraksi DNA merupakan tahap pertama penelitian molekular yang sangat berpengaruh terhadap kualitas isolasi DNA yang diperoleh. Tidak ada teknik ekstraksi DNA yang memberikan keunggulan secara keseluruhan. Pada penelitian ini kedua teknik ekstraksi DNA yang digunakan memberikan perbedaan fasilitas

keunggulan. Metode ekstraksi *Phenol-Chloroform* memberikan keunggulan terhadap harga yang lebih murah, lebih sensitif dalam isolasi DNA, dan menghasilkan pita DNA yang jelas. Keunggulan *KIT Extraction* lebih mudah, cepat, dan DNA yang dihasilkan lebih tebal.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Pereira, F, J. Carneiro, dan A. Amorim. 2008. Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2, 187-200.
- [2] Sari, EM, H. Jianlin, R.R. Noor, C. Sumantri, dan E.T. Margawati. 2016. Phylogenetic analysis of aceh cattle breed of Indonesia through mitochondrial D-loop region. *Journal of genetic engineering and biotechnology* 14:227-231.
- [3] Swaran, Y.C. 2014. Direct PCR in Forensic Science- An overview. *Malaysian Journal of Forensic Sciences*, 5(2):6-12.
- [4] Teranishi, H, dan K. Ouchi. 2014. Detection of bacteria, fungi, and viruses by a real-time PCR assay using universal primers and probes from blood in patients with febrile neutropenia. *Kawasaki Medical Journal* 40(1):1-11.
- [5] Rompre, A, P. Servais, J. Baudart, M.R. de-Roubin, dan P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49 : 31–54.
- [6] Rawat, S, G. Joshi, D. Annapurna, A. N. Arunkumar, dan N.N. Karaba. 2016. Standardization of DNA Extraction Method from Mature Dried Leaves and ISSR-PCR Conditions for *Melia dubia* Cav. A Fast Growing Multipurpose Tree Species. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 437-445.
- [7] Fang, G, S. Hammar, dan R. Grumet. 1992. A Quick and Inexpensive Method for Removing Polysaccharides from Plant Genome DNA. *BioTechniques*, 13, 52-56.
- [8] Fatchiyah, E.L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- [9] Sambrook, J, E.F. Fritsch, dan T. Miniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [10] Buchanan R. W, Julie Kreyenbuhl, Julie M. Zito, and Anthony Lehman. 2002. The Schizophrenia PORT Pharmacological Treatment Recommendations: Conformance and Implications for Symptoms and Functional Outcome. *Schizophrenia Bulletin*, Vol. 28, No. 1, 200.
- [11] Byun, S.O, Q. Fang, H. Zhou, dan J.G.H. Hickford. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrilamid gels. *Anal Biochem*, 385, 174-175.
- [12] Wulandhari, A. 2009. Optimalisasi Hasil Ekstraksi DNA dari Darah Segar Sapi Menggunakan *High Salt Method* dengan Perbandingan Darah dan *Lysis Buffer* pada Kecepatan Sentrifugasi Berbeda. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [13] Budi, P.A, R.S. Purbowotiningrum, dan A.L.N. Aminin. 2011. Purifikasi DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYtae14 menggunakan kolom silika dengan denaturan urea. *Jurnal Sains dan Matematika*, 19(4), 101-106.
- [14] Ebeling, W. 1974. Proteinase K From *Trilirachium album* Limber. *Eur J Biochem*, 47, 91-97.

- [15] Montgomery, G. W. dan J. A. Sise. 1990. Extraction DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Vol. 33 : 437-441.
- [16] Kado, C.I dan S.T. Liu. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*. 145 (3), 1365-1373.
- [17] Renshaw *et al.* 2015. The room temperature preservation of filtered environmental DNA Samples and Assimilation Into a Phenol–Chloroform–Isoamyl Alcohol DNA Extraction. *Journal Molecular Ecology Resources*. Volume 15, Issue 1 January 2015 Pages 168–176.