

ISOLASI DAN DIGESTI DNA KROMOSOM

ISOLATION AND DIGESTION OF CHROMOSOMAL DNA

Mukhlissul Faatih

Jurusan Pendidikan Biologi FKIP
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan Kartasura Surakarta
Telp. (0271) 717417 ext 171

ABSTRAK

Isolasi DNA/RNA merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam proses rekayasa genetika sebelum melangkah ke proses selanjutnya. Prinsip dasar isolasi total DNA/RNA dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri DNA, RNA dan substansi dasar lainnya. Ekstrak sel kemudian dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA/RNA total. Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Isolasi sel; (2) Lisis dinding dan membran sel; (3) Ekstraksi dalam larutan; (4) Purifikasi; dan (5) Presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada 2, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul. Dengan menjalankan prosedur dengan benar akan diperoleh DNA kromosom dan plasmid dengan kemurniannya cukup tinggi, dapat dilihat dari penampakan hasil elektroforesis yang baik. Ketelitian dan kecermatan dalam pelaksanaan penelitian, sangat menentukan hasil kemurnian DNA kromosom dan plasmid.

Kata Kunci: *Isolasi, purifikasi, digesti, dan DNA.*

ABSTRACT

Isolation of DNA/RNA is the first step that must be completed in process of genetic engineering. The basic principal of total DNA/RNA isolation is breaking down and extracting cells' components. Cells extract then was further purified, producing pellets which is contain of DNA, RNA, and other substances. DNA isolation has several steps, i.e. (1) cells isolating, (2) cells membrane and wall lysing, (3) extracting, (4) purifying, and (5) precipitating. Two principal in the DNA isolation are cells centrifuge and precipitate. Centrifugation separates the cells substance due to their molecular weight. Completing this procedures will give a high-pured DNA, showed in the electrophoresis banding results.

Keywords: *Isolating, purification, digestion, dan DNA.*

PENDAHULUAN

DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang antiparalel dengan komponen-

komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin.

Basa purin terdiri atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincin-ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal. Ketika guanin berikatan dengan sitosin, maka akan terbentuk tiga ikatan hidrogen, sedangkan ketika adenin berikatan dengan timin maka hanya akan terbentuk dua ikatan hidrogen. Satu komponen pembangun (*building block*) DNA terdiri atas satu gula pentosa, satu gugus fosfat dan satu pasang basa yang disebut nukleotida.

Sebuah sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan bersifat hereditas pada seluruh sistem kehidupan. Genom adalah set lengkap materi genetik (DNA) yang dimiliki suatu organisme dan terorganisasi menjadi kromosom. DNA dapat diisolasi, baik dari sel hewan, manusia, maupun pada tumbuhan. DNA manusia dapat diisolasi melalui darah. Darah manusia terdiri atas plasma darah, globulus lemak, substansi kimia (karbohidrat, protein dan hormon), dan gas (oksigen, nitrogen dan karbon dioksida). Plasma darah terdiri atas eritrosit (sel darah merah), leukosit (sel darah putih) dan trombosit (platelet). Komponen darah yang diisolasi yaitu sel darah putih. Sel darah putih dijadikan pilihan karena memiliki nukleus, dimana terdapat DNA di dalamnya. DNA pada tumbuhan juga dapat diisolasi, contohnya pada tumbuhan bawang merah (*Allium cepa*) dan pada pisang (*Musa sp.*).

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Isolasi sel; (2) Lisis dinding dan membran sel; (3) Ekstraksi dalam larutan; (4) Purifikasi; dan (5) Presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada 2, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat

jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (*rotation per minute*) atau 3000 rpm.

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

Langkah pertama untuk mendapatkan DNA plasmid adalah dengan menumbuhkan sel-sel bakteri yang mengandung plasmid rekombinan. Setelah itu sel dipanen, dinding serta membran sel dipecah sehingga isi sel (ekstrak sel) keluar. Ekstrak sel ini kemudian dipurifikasi dengan serangkaian perlakuan sehingga diperoleh DNA plasmid yang murni. Isolasi DNA yang dilakukan dalam penelitian ini menurut standar prosedur yang sudah biasa dilaksanakan. Homogenisasi sel dengan prosedur ini akan menghasilkan DNA utuh karena proses ini menyebabkan disrupsi sel dan tercucinya komponen-komponen sel lain selain DNA. Penambahan kloroform setelah sentrifugasi memisahkan larutan menjadi fase cair dan padat dimana fase cair merupakan DNA dan fase padat adalah campuran protein dan DNA.

METODE PENELITIAN

Untuk penelitian prosedur isolasi DNA jaringan total diperlukan koloni bakteri, Buffer lisis (100 mM Tris HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA; 2% SDS), Proteinase-K, Phenol, Etanol,

Sedangkan untuk isolasi plasmid dengan diperlukan kultur bakteri, *Lysing solution 1* (50 mM Glukosa, 25 mM Tris-HCl dan 10 mM EDTA, pH 8,0), *Lysing solution 2* (0,4 N NaOH dan 2% SDS), *Lysing solution 3* (3 M kalium asetat pH 4,8), LB medium, Trypton, Yeast ekstrak, NaCl, dan Aquabidest.

Adapun alat yang diperlukan adalah mikropipet, sentrifus mikro, Eppendorf, microtube dan conical tube.

Pelaksanaan penelitian dimulai prosedur isolasi DNA kromosom, yaitu:

1. Bakteri ditumbuhkan pada medium LB, digojog pada suhu 37°C, selama 1 malam.
2. 15 ml kultur disentrifugasi 3000 rpm, 15 menit, pada suhu 4°C.
3. Supernatan dibuang, pada pelet ditambahkan 750 µl buffer lisis (100mM Tris HCl pH 8, 100mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS), lalu divortek.
4. 10 µl (10 mg/ml) Proteinase-K ditambahkan.
5. Diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit.
6. Disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm, selama 15 menit, pada suhu 4°C.
7. Dipindahkan supernatannya pada tabung eppendorf 1,5 ml.
8. Kemudian ditambahkan 700 µl phenol, digojog pelan.
9. Disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit, lapisan atas dipindahkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml.
10. Ditambahkan etanol dingin, perbandingan 1:1 (v/v), dicampur pelan-pelan

sehingga timbul benang-benang halus DNA.

11. Benang-benang halus DNA diambil dan dicuci dengan etanol 70%
12. Disentrifugasi 12000 rpm, 10 menit, supernatan dibuang, pelet dikeringkan.
13. Ditambahkan TE, hingga volume 200 ml

Langkah kedua adalah prosedur isolasi DNA plasmid, yaitu:

1. Diambil sebanyak 1-2 koloni bakteri dari lempeng agar, dipindahkan kedalam tabung yang telah berisi 5 ml LB-medium dan antibiotik.
2. Digojok kuat-kuat dalam *shaker incubator* 37°C, semalam
3. Disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit.
4. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan 100 ml *Lysing solution 1*, didiamkan dalam es selama 5 menit.
5. Ditambahkan 200 ml *Lysing solution 2*, diinkubasi pada es selama 5 menit.
6. Ditambahkan 150 ml *Lysing solution 3*, dicampur dengan cara membolak-balik-kan, diinkubasi dalam es selama 5 menit.
7. Disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.
8. Supernatan diambil dalam filter, pellet dibuang.
9. Ditambah phenol CIAA sebanyak volume supernatan, dicampur dengan vortek
10. Disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit.
11. Lapisan atas diambil, ditambahkan CIAA dengan perbandingan 1:1 (v/v)
12. Dicampur dengan vortek
13. Disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit, kemudian lapisan atas diambil
14. Ditambah 1/10 volume 3M Na asetat, dan 2 kali volume ethanol absolut dingin.

15. Dicampur dengan dibolak-balik, didiamkan dalam -20°C selama 10 menit.
16. Disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, lalu pellet dicuci dengan etanol 70%
17. Disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit
18. Pellet dikeringkan, ditambah TE 50 μl , DNA dielektroforesis.

Langkah ketiga adalah melakukan prosedur digesti kromosom, plasmid dan pUC19 dengan Eco RI, yaitu:

Kromosom, plasmid dan pUC 19
(Konsentrasi 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2 μl Buffer Eco RI
2 μl Eco RI
8 μl Nuclease Free Water
↓
Volume Akhir 20 μl
Campur dengan baik

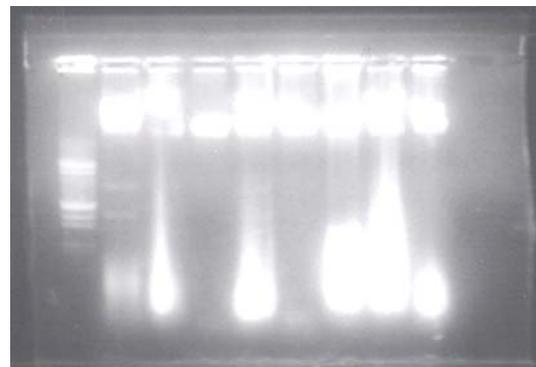
Inkubasi 37°C , 2 jam
(Untuk melihat hasil pemotongan dilakukan *running*)

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. Dilihat dari organismenya, struktur DNA prokariot berbeda dengan struktur DNA eukariot. DNA prokariot tidak memiliki protein histon dan berbentuk sirkular, sedangkan DNA eukariot berbentuk linear dan memiliki protein histon. Pada isolasi DNA, pengerjaannya harus sangat hati-hati karena DNA sangat mudah rusak oleh enzim DNase yang terdapat pada kulit, saliva maupun air mata

pemeriksa. Oleh karena itu selama pengerjaan harus mengenakan sarung tangan dan berbicara sesedikit mungkin.

Buffer lisis dan Proteinase-K disini dipakai sebagai reagen pelisis supaya komponen DNA dalam sitoplasma sel bisa keluar dan diisolasi. Phenol digunakan untuk mengendapkan komponen protein lain yang tidak dikehendaki sedangkan etanol 70% sebagai pencuci hasil isolasi. Hasil isolasi DNA diperlihatkan dengan di elektroforesis pada agarose gel (gambar 1).



Line: 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Gambar 1. Hasil Elektroforesis Gel Agarose (1%) dari Total DNA kromosom.

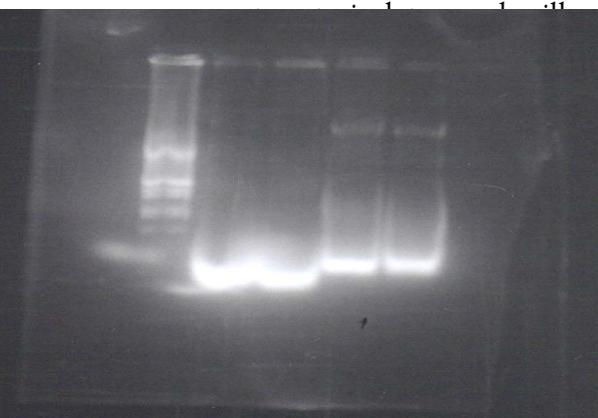
Keterangan : Line 1 : marker; Line 2 : *E. coli*; Line 3 : *E. coli*; Line 4 : *Salmonella* sp.; Line 5 : *E. coli*; Line 6 : *Salmonella* sp.; Line 7 : *E. coli*; Line 8 : *Salmonella* sp.; Line 9 : *Salmonella* sp.

Dari hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA tampak jelas (berarti jumlah DNA yang terdeteksi banyak), sedangkan bagian bawah gel agarose masih terdapat berkas. Kemungkinan hal itu disebabkan adanya protein lain atau ada bagian-bagian sel yang terikut (debris sel) pada saat isolasi DNA. Jadi pada isolasi DNA ini kita mendapatkan DNA yang belum benar-benar murni.

Tabel 1. Konsentrasi DNA Kromosom Hasil Isolasi

DNA	Absorbansi		Konsentrasi DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Rasio $\lambda 260 / \lambda 280$
	$\lambda 260$	$\lambda 280$		
<i>E. coli</i>				
1	0.276	0.158	13.8	1.75
2	1.415	1.11	70.75	1.27
3	0.207	0.195	10.35	1.06
4	1.275	0.663	63.75	1.92
<i>Salmonella</i>				
1	1.117	0.976	55.85	1.14
2	0.793	0.531	39.65	1.49

Nilai perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dapat digunakan sebagai indikator kemurnian DNA (tabel 1). DNA dinyatakan murni apabila memiliki nilai perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($A_{260}:A_{280}$) berkisar 1,8-2. Hasil pengamatan kualitas DNA dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa



DNA plasmid dengan serapan menunjukkan RNA dalam diperkirakan diperlakukan la perlakuan i DNA kro- dengan nilai man mengan- $A_{260}:A_{280}$

Setelah dilakukan inkubasi, sitoplasma sel yang telah bercampur dengan pelisis sel tersebut lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya supernatan yang terbentuk dibuang dan kemudian dilakukan ekstraksi di dalam larutan. Hal tersebut bertujuan agar didapat ekstrak nukleus sel. Tahap berikutnya adalah purifikasi. Tahap ini bertujuan untuk mem-bersihkan nukleus sel dari zat-zat lainnya, dan tahap terakhir, yaitu presipitasi bertujuan untuk mengendapkan protein, sehingga untai-untai DNA tidak lagi menggulung (*coiling*), yang menyebabkan DNA menjadi terlihat.

Gambar 2. Hasil Elektroforesis Plasmid DNA

Keterangan: Line 1: Marker; Line 2: Plasmid *E. coli*; Line 3: Plasmid *Salmonella sp.*; Line 4: plasmid *E. coli* (yang diambil untuk digesti); Line 5: plasmid *Salmonella sp.*

Hasil elektroforesis DNA plasmid (gambar 2) menunjukkan pita-pita yang tebal dan *smear*, berarti dalam penelitian ini menghasilkan isolasi DNA plasmid yang belum murni (terdapat berkas debris sel atau DNA kromosom) dan dalam jumlah yang banyak. Pada line 2 dan 3 plasmid *E.*

1. minimum seperti protein serta senyawa-senyawa organik lainnya.

Ada 5 tahap untuk melakukan isolasi DNA, yaitu: isolasi sel, pelisis dinding dan membran sel, pengekstraksian dalam larutan, purifikasi, dan presipitasi. Tahap pertama yang dilakukan yaitu mengisolasi sel yang ingin digunakan, yaitu sel bakteri. Tahap selanjutnya yaitu melisis dinding dan membran sel dengan larutan pelisis sel.

coli dan *Salmonella* sp. tidak terlihat adanya pita, disebabkan oleh konsentrasi yang terlalu rendah atau bahkan plasmid tidak terisolasi. Line 4 dan 5 terlihat adanya pita yang menunjukkan bahwa plasmid sudah terisolasi dari sampel. Ukuran sebenarnya dari plasmid ini belum dapat ditentukan melalui gel agarose elektroforesis karena tidak adanya penanda berat molekul yang sesuai. Dalam beberapa isolat (line 4 dan 5) dapat dilihat adanya pita DNA plasmid samar. Pita DNA ini dapat berarti adanya plasmid yang berukuran sama yang telah terpotong menjadi linear akibat proses isolasi DNA plasmid.

Dalam pelisisan dinding sel digunakan antibiotik, lalu disentrifugasi untuk memperoleh sel. Selanjutnya digunakan larutan pelisis sel *lysing solution* yang mengandung EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) yang akan membentuk kompleks (*chelate*) dengan ion logam, seperti Mg^{2+} yang merupakan kofaktor DNase. Selanjutnya tabung dibolak-balik dengan gerakan memutar yang membentuk angka 8 agar larutan dapat menyatu dengan sempurna selama 10 menit. Sel yang telah bercampur dengan pelisis sel tersebut lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Selanjutnya supernatan yang terbentuk diambil dalam filter, sedangkan pellet dibuang. Tahap selanjutnya yaitu purifikasi. Purifikasi bertujuan untuk membersihkan plasmid dari zat-zat lainnya, kedalam larutan tadi kemudian diberikan fenol CIAA lalu divortex dan disentrifugasi, dilakukan berulang. Hal tersebut bertujuan untuk mengoptimalkan kerja CIAA. Sehingga supernatan yang mengandung plasmid dipisahkan, pellet dibuang. Tahap berikutnya yaitu presipitasi; dilakukan dengan cara meneteskan larutan presipitasi protein dan kemudian divortex yang bertujuan untuk

menghomogenkan larutan. Larutan presipitasi protein terdiri atas kalium asetat atau Na-asetat yang jika berikatan dengan protein mengakibatkan terbentuknya senyawa baru yang memiliki kelarutan yang lebih rendah, sehingga menyebabkan plasmid mengendap. Hasil dari sentrifugasi adalah terdapatnya pelet DNA plasmid pada dasar tabung yang kemudian ditambahkan etanol 70% dan dibolak-balik kembali. Pemberian etanol bertujuan untuk membersihkan DNA plasmid dari pengotor-pengotornya. Hasil akhirnya adalah DNA plasmid yang berada pada tepi dasar tabung. Langkah akhirnya adalah dengan pemberian Tris-EDTA yang bertujuan untuk melarutkan kembali DNA plasmid untuk dipreservasi.

Gambar 3. Hasil digesti DNA dan plamid kromosom. Digesti menggunakan EcoRI.

Keterangan : Line 1: marker lambda DNA EcoRI/HindIII; Line 2: Plasmid PUC 19 utuh; Line 3: Kromosom *Salmonella* sp. utuh; Line 4: digesti PUC hasil isolasi (*E. coli* line no 4); Line 5: digesti Kromosom *E. coli* (kelompok 4); Line 6: Digest kromosom *E. coli* (kelompok 2); Line 7: digest kromosom *Salmonella* sp. (kelompok 2); Line 8: digest kromosom *Salmonella* (kelompok 1)

DNA kromosom dan plasmid hasil isolasi dipotong dengan enzim restriksi endonuklease Eco RI, kemudian dilakukan analisa melalui elektroforesis (gambar 3). Line 2 terlihat pita yang lebar, disebabkan ada plasmid yang supercoil sehingga mempunyai ukuran yang lebih pendek dibanding yang relaks. PUC masih dalam keadaan sirkuler sehingga ukurannya tidak bisa dibandingkan dengan marker. Line 3 : adalah kromosom utuh sehingga tidak bisa dibandingkan dengan marker. Line 4 : Hasil digesti PUC, PUC 19 hanya memiliki satu *site* untuk Eco RI sehingga hasil digesti menghasilkan membentuk satu pita dengan ukuran (lihat dimarker). Line 5 sampai 8 : perbedaan pola pita dan smear ini, hal ini disebabkan karena konsentrasi DNA yang berbeda dan jumlah DNA yang

terpotong. Kromosom mempunyai *restriction site* Eco RI banyak dan panjang fragment yang dihasilkan bervariasi, sehingga terlihat pita-pita yang sangat rapat (*smear*).

SIMPULAN

Isolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid dapat dilakukan dengan menggunakan prosedur isolasi sel; lisis dinding dan membran sel; ekstraksi dalam larutan; purifikasi; dan presipitasi. Diperoleh DNA kromosom dan plasmid dengan kemurniannya cukup tinggi dilihat dari hasil elektroforesis yang baik. Ketelitian dan kecermatan dalam pelaksanaan penelitian, sangat menentukan hasil kemurnian DNA kromosom dan plasmid.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama, W.T. 1991. *Rekayasa Genetika*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi. UGM. Yogyakarta.
- Ausabel. F.M, et al. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology, Third ed.* John Wiley & Sons. Inc. USA.
- Brown, A.T. 1991. *Pengantar Kloning Gen* (Alih bahasa: S.A. Muhammad dan Praseno). Yayasan Esensia Medika. Yogyakarta.
- Kimbal, John W. 1989. *Biologi. Edisi kelima cetakan kedua*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar - dasar Biokimia. jilid 1*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Lodish, Harvey, et al. 2001. *Molecular Cell Biology, Fourth Edition*. W.H. Freeman and Company. New York.
- Murray. R.K, at al. 1995, *Biokimia Harper*, edisi ke-22. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Mubarika, Sofia. 1990. *Rekayasa Genetika*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Sambrook, L., et al. *Molecular Clonning : A laboratory Manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmid, R.D. 2003. *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*. Wiley-VCH. Germany.
- Watson, James D. Tooze, John. Kurtz, David T. 1988. *DNA Rekombinan*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Weaver, R.F. 1999. *Molecular Biology*. WCB McGraw-Hill Publisher. USA.