

Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

The Comparison Lysis Methods of Animal Tissue in Genomic DNA Isolation Process in Liver Organ of White Rat (*Rattus Norvegicus*)

Slamet Hariyadi*, Erlia Narulita, M Amien Rais

Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Univeritas Jember, Jember, Indonesia.

*Corresponding author: s.hariyadi.fkip@unej.ac.id

Abstract: Teknik dasar yang harus dikuasai pada saat melaksanakan penelitian secara molekuler adalah isolasi DNA genom. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen lainnya seperti lipid, protein, dan polisakarida. Secara umum, tahapan isolasi DNA untuk berbagai bahan adalah sebagai berikut : lisis sel atau jaringan yang efektif, denaturasi kompleks nukleoprotein, dan inaktivasi nuklease. Akan tetapi bahan yang berbeda akan membutuhkan metode yang berbeda juga. Salah satu jaringan yang sulit untuk dilakukan isolasi DNA adalah jaringan hewan. Jaringan hewan memiliki lemak dan protein yang sangat banyak sehingga dapat mengkontaminasi DNA itu sendiri. Tahapan lisis adalah tahapan penting yang mempengaruhi kesuksesan isolasi DNA hewan. Terdapat berbagai macam cara yang dapat dilakukan untuk melisis sel dan jaringan. Pada penelitian ini dilakukan perbandingan proses lisis dengan 4 perlakuan yang berbeda yakni lisis dengan menggunakan teknik Sambrook (1987) dimana jaringan di inkubasi dengan suhu 55 °C selama 12 jam, lisis dengan dengan metode Penggerusan yakni menggunakan mortar dan pestel, lisis dengan suhu 65 °C dalam inkubasi selama 2 jam, dan lisis dengan suhu 80 °C dalam inkubasi selama 10 menit. Setelah tahapan lisis selesai, ke empat perlakuan di ekstraksi dengan metode organik (*Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol* 25 : 24 : 1), DNA kemudian cuci dengan menggunakan ETOH 70% dan pelet DNA dilarutkan dengan menggunakan buffer TE. Hasil menunjukkan bahwa teknik Sambrook menunjukkan hasil yang lebih baik, berikutnya metode inkubasi 65 derajat selama 2 jam yang menunjukkan hasil baik, sementara metode lisis dengan mortar dan pestel, maupun dengan inkubasi 80 derajat selama 10 menit tidak menunjukkan hasil yang baik akibat terjadi kerusakan DNA.

Keywords: Isolasi, DNA, Jaringan, Hewan, Lisis

1. PENDAHULUAN

Ilmu pengetahuan dan teknologi pada saat ini berkembang dengan sangat cepat. Perkembangan tersebut juga merambah ke ranah bioteknologi dan biomolekular. Isolasi DNA merupakan teknik dasar dari bioteknologi dan biomolekular yang harus dikuasai di laboratorium. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya. Isolasi DNA berguna untuk beberapa analisis molekuler dan rekayasa genetika seperti genom editing, transformasi dan PCR. Banyak sekali metode isolasi DNA yang bisa digunakan, akan tetapi pada dasarnya tahapan dari isolasi DNA pada semua bahan dan semua metode adalah sama, yakni lisis sel atau jaringan yang efektif, denaturasi kompleks nukleoprotein, dan inaktivasi nuklease (Tan et al, 2009) Proses lisis adalah proses awal yang menentukan keberhasilan suatu isolasi DNA (Gill, 2016). Ada berbagai cara yang dapat digunakan dalam tahap lisis yakni cara kimia dengan

menggunakan enzim seperti proteinase-K dan SDS dan dengan cara mekanik seperti penggerusan dengan menggunakan nitrogen cair (Ahari, 2012), dan inkubasi dengan menggunakan perlakuan suhu (Espinoza, 2017). Isolasi DNA dapat dilakukan pada semua makhluk hidup dan juga virus. Salah satu tantangan dalam isolasi DNA adalah isolasi DNA pada organisme hewan mamalia. Mamalia memiliki kompleksitas jaringan dan organ yang sangat tinggi, sehingga terdapat berbagai macam kendala yang sering ditemui dalam proses pengerjaan isolasi DNA pada hewan seperti terlalu banyaknya lipid dan protein yang menyusun suatu jaringan, dan adanya enzim nuklease pada beberapa organ hewan yang juga dapat merusak asam nukleat (Cseke, 2012). Masalah lain yang juga ditemukan dalam proses isolasi DNA hewan adalah tingkat ketahanan dari organ atau jaringan hewan tidak seperti tumbuhan dan lainnya, jaringan hewan dapat membusuk dengan cepat dan menyebabkan kerusakan dalam jaringannya dalam waktu yang singkat, sehingga disarankan dalam proses isolasi DNA hewan digunakan sampel yang masih segar. Akan tetapi, untuk melakukan isolasi DNA hewan dengan



menggunakan sampel segar sangatlah sulit. Organ yang telah di ambil setelah pembedahan harus diawetkan dan disimpan dalam freezer apabila akan digunakan pada lain hari. Banyaknya kendala yang ada dalam proses isolasi DNA hewan dari jaringan atau organ yang diawetkan menyebabkan tingkat keberhasilan isolasi DNA hewan tersebut menjadi semakin minimum. Oleh sebab itu, perlu adanya optimalisasi metode yang bisa digunakan untuk memperoleh DNA yang baik dan selanjutnya dapat digunakan dalam proses bioteknologi dan biomolekular.

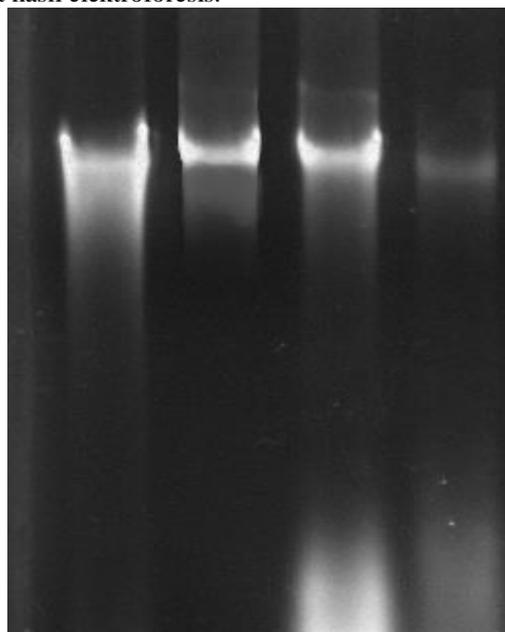
2. METODE

Tikus putih yang digunakan untuk diambil sampelnya pada penelitian kali ini berasal dari strain wistar yang didapatkan dari toko petshop aneka hewan jember. Tikus putih tersebut di aklimatisasi selama 7 hari dan diberi makan dan minum selama duakali sehari. Setelah tahap aklimatisasi berakhir, tikus putih tersebut di bedah dan diambil organ hati dari tikus putih tersebut dengan menggunakan alat seksi yang steril. Organ tersebut kemudian di potong dan dimasukkan dalam tabung eppendorf baru yang steril. Selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C sampai tahap isolasi DNA akan dilakukan. Sampel yang digunakan kemudian di timbang sebanyak 60 mg kemudian masing-masing diberi buffer ekstraksi (10mM Tris, 100mM EDTA, 400mM NaCl, 3% SDS) dan proteinase-K sebanyak 5 mikroliter, selanjutnya perlakuan lisis yaknidengan berbagai cara inkubasi dengan suhu 55 derajat selama overnight, inkubasi selama 2 jam dengan suhu 65 derajat, dan dengan cara penggerusan. Setelah jaringan tersebut tampak homogen, dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan dari hasil sentrifugasi tersebut kemudian dipindah kedalam tabung eppendorf baru, kemudian protein dan lipid di presipitasi dengan menggunakan Phenol Chlorofom Isoamyl Alcohol (25 : 24 : 1) di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit diambil bagian supernatannya. Proses tersebut dilakukan selama 2 kali dan selanjutnya zat lainnya seperti polisakarida di presipitasi dengan menggunakan chlorofom isoamyl alcohol (25:1) sebanyak 1 kali. Supernatant yang di dapatkan kemudian di presipitasi dengan menggunakan isopropanol absolut, kemudian untuk memaksimalkan perolehan DNA, di inkubasi dalam suhu -20°C selama 1 jam. Setelah itu DNA kemudian di peletkan dengan cara di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C . Pelet DNA kemudian di cuci dengan menggunakan etanol 70%, kemudian pelet dikering anginkan dan diencerkan dengan buffer TE sebanyak 30-50 mikroliter tergantung dari banyaknya pelet DNA yang terbentuk. Proses elektroforesis DNA dilakukan dengan mengambil larutan DNA sebanyak 5 mikroliter kemudian memberikan pewarnaan DNA dengan menggunakan loading dye sebanyak 1 mikroliter. DNA tersebut selanjutnya di running pada TAE gel agarosa 1% dengan arus 100volt dan waktu selama 30 menit.

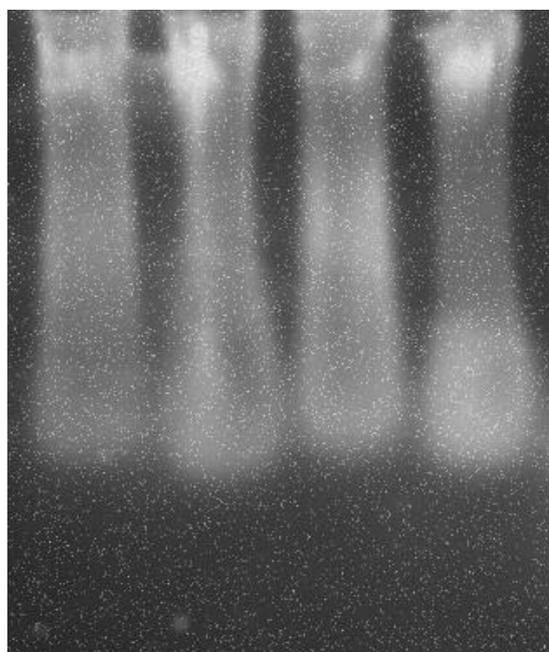
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil menunjukkan bahwa DNA yang di ekstraksi dengan metode lisis secara overnight (12 jam) (Sambrook et al, 1987) menunjukkan hasil yang lebih

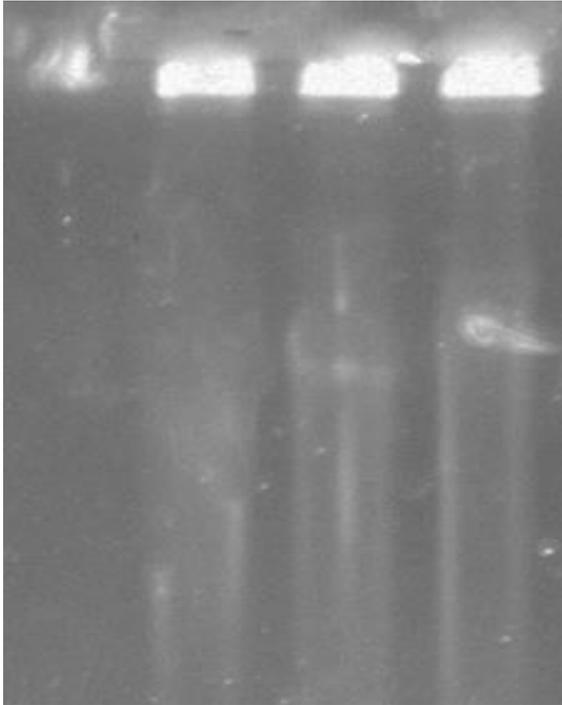
baik dibandingkan dengan metode yang lain (metode lisis selama 2 jam, metode lisis selama 10 menit, dan metode gerus) sedangkan metode lisis dengan suhu 65 derajat menunjukkan hasil yang lebih bagus dibandingkan dengan metode penggerusan. Metode penggerusan menunjukkan hasil DNA yang kurang bagus, akan tetapi masih menunjukkan keberadaan DNA pada hasil elektroforesis. Pada perlakuan inkubasi dengan suhu 80 derajat selama 10 menit tidak menunjukkan adanya kemunculan DNA pada saat hasil elektroforesis.



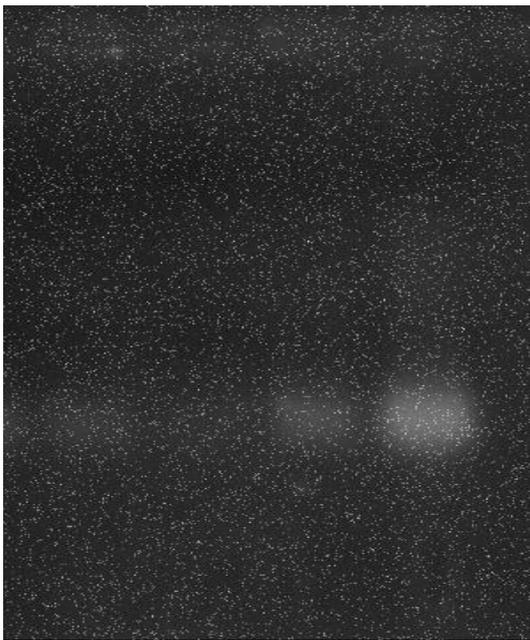
Gambar 1 : Hasil isolasi DNA dengan teknik Sambrook



Gambar 2 : Hasil isolasi DNA dengan metode Penggerusan dengan menggunakan mortar dan prestel



Gambar 3 : Hasil isolasi DNA dengan metode lisis dengan suhu 65 °C dalam inkubasi selama 2 jam



Gambar 4 : Hasil isolasi DNA dengan metode lisis dengan suhu 80 °C dalam inkubasi selama 10 menit.

Berdasarkan hasil isolasi diatas, DNA yang di ekstraksi selama 12 jam dengan metode lisis secara overnight menunjukkan hasil yang lebih jelas dibandingkan dengan metode lisis 2 jam, metode lisis 10 menit, dan metode gerus. Hal ini disebabkan protein yang dapat mengkontaminasi kemurnian DNA akan mengalami denaturasi pada suhu diantara 45-60 derajat ketika di inkubasi selama 10-12 jam (Paul, 1996). Selain itu enzim yang dapat mengakibatkan kerusakan DNA seperti enzim

nuklease akan dinonaktifkan pada kondisi tersebut. Inkubasi dengan suhu 55 derajat akan membuat Proteinase-K akan bekerja secara maksimal dan optimum dalam menghancurkan protein dan menginaktivasi enzim nuklease yang dapat merusak DNA (Qamar, 2017). Kerja EDTA akan maksimal dalam waktu yang cukup lama sehingga pada perlakuan inkubasi selama overnight 12 jam menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan hasil yang lain. Selanjutnya pada metode lisis dengan suhu 65 derajat selama 2 jam menunjukkan hasil yang bagus dibandingkan dengan metode penggerusan. Pada suhu 65 derajat, protein dapat terdenaturasi dengan baik akan tetapi beberapa polisakarida tidak terdenaturasi secara sempurna apabila hanya dilakukan pada waktu 2 jam saja. Protein dan polisakarida akan berinteraksi dengan air sehingga mengalami denaturasi paling tidak membutuhkan waktu selama 3 jam (Christensen, 2012). Ketika pada saat tahap lisis, buffer ekstraksi yang mengandung larutan EDTA akan mencegah dan merusak enzim nuklease, sehingga aktivitas dari endonuklease yang ada dalam sel dan jaringan dapat di tekan atau bahkan dihilangkan (Kotikalapudi, 2015).

Pada metode penggerusan menunjukkan hasil DNA yang kurang baik, akan tetapi masih menunjukkan keberadaan DNA pada hasil elektroforesis. Penggerusan yang dilakukan tidak menggunakan nitrogen cair, melainkan hanya di gerus dengan menggunakan mortar biasa, sehingga protein, lipid, dan polisakarida lainnya tidak dapat hancur dan mengkontaminasi DNA. Hal tersebut dapat terlihat ketika tahapan ekstraksi dengan menggunakan PCI pada saat akan mengambil supernatant yang mengandung DNA, maka *middle layer* yang merupakan protein dan lipid juga akan ikut terambil dan mengotori DNA. Pada saat protein mengkontaminasi DNA dan DNA tersebut kemudian di elektroforesis terlihat band DNA mengalami degradasi (Tan, 2009). Enzim nuklease yang ada pada setiap sel dan jaringan juga kurang terkontrol sehingga menyebabkan rusaknya sebagian molekul DNA. Terakhir pada perlakuan inkubasi dengan suhu 80 derajat selama 10 menit tidak menunjukkan adanya kemunculan DNA pada saat hasil elektroforesis. Hal ini dapat dimungkin bahwa pada suhu mencapai 80 derajat. DNA yang berada pada suhu tinggi akan mengalami kerusakan dan mengalami putusnya ikatan fosfat dan ikatan kovalen pada DNA (Karni, 2013) sehingga yang terlihat pada hasil elektroforesis adalah DNA yang terdegradasi dan RNA yakni partikel yang jauh lebih ringan dari DNA.



4. SIMPULAN

Proses lisis yang baik dalam proses isolasi DNA hewan adalah dengan menggunakan inkubasi selama overnight (12 jam) dengan suhu 55 derajat. Apabila mendadak, lisis dapat dilakukan dengan inkubasi selama 2 jam dengan suhu 65 derajat. Penggerusan dapat pula mempercepat dalam proses lisis akan tetapi hasil yang diperoleh tidak maksimal. Inkubasi dengan suhu 80 derajat selama 10 menit dapat mempercepat proses lisis akan tetapi akan merusak DNA sehingga DNA tidak muncul saat proses elektroforesis.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan dalam bentuk yang pendek, ditujukan kepada sponsor riset atau pihak yang tidak bisa disebutkan dalam bagian penulis.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Cseke, Leland J., Joseph R. Herdy. 2012. *Laboratory Methods in Cell Biology*. USA : Academic Press
- Gill, Christina., Janneke H.H.M. vande Wijgert., Frances Blow., Alistair C. Darby. 2016. Evaluation of Lysis Methods for the Extraction of Bacterial DNA for Analysis of The Vaginal Microbiota. *Journal Plos One* - doi : 10.1371/journal.pone.0163148
- Tan, Siun Chee., Beow Chin Yiap. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2009, Article ID 574398,
- Espinoza, Pavel., Ramón Miguel Molina Barrios., Javier Arturo Munguía Xóchihua., Juan Francisco Chávez Hernández. 2017. Fast and reliable DNA extraction protocol for identification of species in raw and processed meat products sold on the commercial market. *Journal Open Agriculture*. Vol 2 No (469–472)
- Ahari, H., Razavilar V., Motalebi A. A., Akbari-adergani B., Kakoolaki S., Shahbazadeh D., Anvar A. A., Mooraki N. 2012. DNA Extraction Using Liquid Nitrogen in *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 11(4) 926- 929
- Sambrook, E.F., Fritsch, T., Maniatis. 1987. *Molecular cloning : a laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Paul, Pauline C., Lis, Butcher., Annemarie Wierenga. 1996. Solubility of Rabbit Muscle Proteins after Various Time-Temperature Treatments. *Journal. Agric. Food Chem.*, 1966, 14 (5), pp 490–492
- Qamar, Wajhul., Mohammad Rashid Khanab., Azher Arafahc. 2017. Optimization of

conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi Journal of Biological Sciences* Volume 24, Issue 7

- Christensen, L., Bertram HC., Aaslyng MD., Christensen M. 2012. Protein denaturation and water-protein interactions as affected by low temperature long time treatment of porcine longissimus dorsi. *Journal of Meat Science*. Volume 88, Issue 4,
- Kotikalapudi, Rosaiah., Rajesh K. Patel. 2015. Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. *Cell J*. 2015 Spring; 17(1): 181–186.

Diskusi:

Penanya:

Endang Setyaningsih (UMS)

Pemberian undur-undur pada saat kapan?

Jawab:

Diberikan pada saat tikus mengalami feypenglikemia

Berpakali dilakukan sentrifuge?

Jawab:

Dilakukan selama 6 kali dari tahap awal sampai akhir penelitian.

Eko Susestyarini

(Universitas Muhammadiyah Malang)

Bagaimana metabolisme pemberian undur-undur

Jawab:

Diberikan setelah undur undur di ekstrak lisis sampei tinggi