

## **Isolasi DNA Skala Kecil** (buah, daging, darah, bakteri)

*Diah Kusumawaty, M.Si*  
*MK: Praktikum Biologi Molekul*  
*Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI*

Pada dasarnya isolasi DNA dapat dilakukan dari berbagai sumber, antara lain organ manusia, darah, daun, daging buah, serangga, kalus, akar batang, daging dan sisik ikan. Pada individu yang sama DNA yang diperoleh dari berbagai sumber akan memiliki jenis jumlah dan ukuran yang sama.

DNA yang diisolasi dari tanaman seringkali terkontaminasi oleh polisakarida dan metabolit sekunder seperti tanin, pigmen, alkaloid dan flavonoid. Sedangkan DNA dari hewan lebih banyak mengandung protein. Salah satu kesulitan isolasi DNA dari tanaman tinggi adalah proses destruksi dinding sel untuk melepaskan isi sel. Hal ini disebabkan karena tanaman memiliki dinding sel yang kuat dan seringkali pada beberapa jenis tanaman, kontaminasi tersebut sulit dipisahkan dari ekstrak asam nukleat. Kehadiran kontaminasi di atas dapat menghambat aktivitas enzim, misalnya DNA tidak sensitif oleh enzim restriksi dan mengganggu proses amplifikasi DNA dengan PCR. Demikian pula pada hewan yang memiliki kandungan kitin (seperti serangga), memerlukan teknik dan metode khusus untuk menghancurkan sel hingga isi dapat terpisah atau keluar dari sel.

Pada praktikum ini kita akan mencoba melakukan isolasi DNA dari beberapa sumber. Yaitu dari buah strawberry, sulur ikan, darah dan bakteri. Tanaman yang digunakan menggunakan jaringan tanaman yang mengandung sedikit kontaminan di atas, misalnya menggunakan daging buah atau daun yang masih muda. Pada saat proses destruksi jaringan tanaman atau hewan maupun bakteri dapat menyebabkan degradasi pada DNA dengan adanya aktivitas enzim endonuklease, karena itu digunakan buffer ekstraksi yang mengandung senyawa Tris, EDTA, CTAB dan buffer lisis yang mengandung potasium asetat dan SDS. Proteinase digunakan untuk membantu mendenaturasi protein pada jaringan. Senyawa CTAB dan SDS merupakan detergen, yang dapat melisis dinding sel dan juga mendenaturasi protein. Selain itu CTAB dan EDTA adalah senyawa inhibitor yang dapat menghambat aktivitas enzim nuklease. Potasium asetat adalah senyawa yang dapat berikatan dengan debris sel dan protein sehingga membentuk senyawa kompleks dengan CTAB-Potasium asetat-protein-debris sel.

Selanjutnya pada tahap berikutnya digunakan kloroform: isoamil alcohol (24:1) yang membantu mendenaturasi protein yang masih menempel pada kromosom, sedangkan untuk mempresipitasi asam nukleat digunakan alkohol 96%-100%. DNA dalam alkohol akan terpresipitasi (menggumpal) sedangkan DNA dalam air akan larut, tetapi protein tidak dapat larut dalam air.

Tujuan : Setelah melakukan pratikum isolasi DNA :

1. Dapat melakukan isolasi DNA dari berbagai jenis jaringan (daging buah, darah, bakteri, daging)
2. Dapat memahami cara kerja senyawa yang digunakan untuk mengisolasi DNA

### **Bahan dan Alat yang digunakan**

- | <b>Bahan</b>   | <b>Alat</b>   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Buffer ekstraksi</li><li>• Buffer lisis 1 (SDS 20%)</li><li>• Buffer lisis 2 (Potasium asetat 5 M)</li><li>• Kloroform : isoamil alcohol = 24 : 1</li><li>• Alkohol 100 % (-20°C)</li><li>• Daging buah atau daun muda</li><li>• Kertas tisu</li><li>• TE</li><li>• Proteinase K (20mg/ml)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Tips berbagai ukuran</li><li>• Tabung 1.5 ml</li><li>• Vorteks</li><li>• Mini sentrifuga</li><li>• Freezer /es batu</li><li>• Water bath 65°C dan 50 ° C</li><li>• Pipet Pasteur</li><li>• Mikropipet berbagai ukuran</li></ul> |

## Cara Kerja

### A. Destruksi Sampel

#### Daun/buah

1. Ambil daun / daging buah sebanyak 0.1-0.5 gram (500 µg atau 500 µl) atau seluas 1-2 cm<sup>2</sup>
2. Hancurkan atau haluskan daging buah/ daun dengan menggunakan blender atau sendok yang ditekan-tekan di atas saringan atau haluskan sampel dengan alu dan mortar
3. Tampung daging buah / daun yang telah halus.
4. Masukkan ke dalam tabung 1.5 ml daging buah atau daun yang telah halus sebanyak 0.1 ml atau 0.1 g (100 µg atau 100 µl)

#### Bakteri

1. Masukkan kultur bakteri ke dalam tabung 1.5 ml yang steril secara aseptik sebanyak 1.5 ml.
2. Sentrifuga tabung dengan kecepatan 10 rpm selama 5 menit.
3. buang supernatan kedalam wadah yang telah berisi alkohol 70%, hati2 jangan sampai endapan terbuang.

#### Daging (ikan)

1. Potong sulur ikan sepanjang 0.5 cm atau daging sebanyak 0.1 gr, masukkan ke dalam tabung 1.5 ml steril.

#### Darah

1. Masukan darah sebanyak 0.1 ml atau 100 µl

### B. Ekstraksi DNA

1. Tambahkan **buffer ekstraksi** sebanyak 4 x volume total sampel.
2. Tambahkan **buffer lisis 1** sebanyak 50 µl
3. Tambahkan enzim proteinase K sebanyak 10 µl
4. Homogenkan dengan alat vorteks selama 5 detik
5. Inkubasikan dalam penangas air pada suhu 55°C selama 45 menit
5. Tambahkan 100 µl **buffer lisis 2**
6. Homogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50x
7. Simpan dalam wadah berisi es atau di dalam freezzer selama 10 menit
8. Sentrifuga sampel pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit (ingat pada saat melakukan sentrifuga, berat sampel yang digunakan harus seimbang)
9. Pindahkan fasa atas ke dalam tabung 1.5 ml yang baru, jangan sampai endapan terbawa
10. tambahkan **kloroform** sebanyak ½ x volume total sampel
11. homogenkan sampel dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 x.
12. Sentrifuga sampel pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
13. Pindahkan fasa atas kedalam tabung baru
14. Tambahkan **alkohol 100%** (-20°C) sebanyak minimal 2 x volume total sampel (atau sampai pada tanda 1.5 ml pada tabung)
15. homogenkan larutan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50x, amati saat membolak-balikkan tabung dan catat yang terjadi.(sampel dalam alkohol dapat disimpan pada suhu -20C untuk membantu proses presipitasi DNA), (untuk praktikum cukup sampai dengan tahap 15)

### C. Presipitasi DNA

16. Sentrifuga pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit
17. buang alkohol, hati-hati jangan sampai endapan DNA ikut terbuang
18. Tambahkan 1 ml **alkohol 70 %**, bolak-balikkan tabung
19. Sentrifuga tabung selama 5 menit dengan kecepatan 14000 rpm
20. buang alkohol, hati-hati jangan sampai endapan DNA terbuang
21. Balikkan tabung dengan hati-hati di atas kertas tisu, biarkan hingga tidak ada lagi alkohol dalam tabung
22. tambahkan **pelarut DNA** sebanyak 20-50 ul (tergantung jumlah asam nukleat/ DNA yang diperoleh)
23. Simpan tabung dalam penangas / oven dengan suhu 50°C selama 5 menit agar DNA dapat larut,bantu larutkan DNA dengan cara menjentik-jentik tabung hingga endapan larut.

24. Sampel DNA siap di elektroforesis