



Teknik Ekstraksi Jaringan DNA Ikan Sidat (*Anguilla sp.*) Di BRPPUPP Palembang

Rosa Damayanti^{1*}, Awalul Fatiqin², Ike Trismawanti³

¹Program Studi Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi, UIN Raden Fatah Palembang

² Balai Riset Perikanan Perairan Umum dan Penyuluhan Perikanan Palembang.

*Email: awalulfatiqin_uin@radenfatah.ac.id

Abstract. DNA extraction is the process and the first step to get the total DNA from a biota. Eel fish (*Anguilla sp.*) is a family of Anguillidae that has a catadromous lifestyle, which starts life from the sea, grows to maturity in fresh water and returns to the sea to spawn. Research on DNA extraction in fish tissue can provide basic information for preserving eel populations. The purpose of this study was to obtain pure DNA in eel through extraction techniques. This research was conducted in February 2020 at the Fish Laboratory, the Fish Taxonomy Laboratory and the DNA Laboratory of the General Aquatic Fisheries Research Institute and Palembang Fisheries Extension. The fish samples used were samples that were already available from the Palembang BRPPUPP laboratory. The part of the sample that was extracted was the fish fin using the standard Genomic DNA Mini Kit method. The result of the research is that pure DNA is obtained which forms a fiber structure and is in the form of pellets that have gone through a series of peripitation and centrifugation processes. The DNA extract that has been obtained and dissolved in a buffer solution is then stored in a freezer at a temperature of around -20°C , so that the extracted DNA sample can be stored for weeks. From the results obtained, it is concluded that DNA extraction is useful in obtaining pure DNA.

Keyword: Extraction; DNA; Network; Eel Fish (*Anguilla sp.*); Genomic DNA Mini Kit

Abstrak. Ekstraksi DNA adalah proses dan tahapan pertama yang dilakukan untuk mendapatkan total DNA dari suatu biota [6]. Ikan Sidat (*Anguilla sp.*) merupakan familia dari Anguillidae yang memiliki pola hidup katadromous yaitu memulai kehidupan dari laut, tumbuh menjadi dewasa di perairan tawar dan kembali ke laut untuk memijah [9]. Penelitian ekstraksi DNA pada jaringan ikan dapat memberikan informasi dasar untuk menjaga kelestarian populasi ikan sidat. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan DNA murni pada ikan sidat melalui teknik ekstraksi. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2020 bertempat di Laboratorium Ikan, bagian Laboratorium Taksonomi Ikan dan Laboratorium DNA Balai Riset Perikanan Perairan Umum dan Penyuluhan Perikanan Palembang. Sampel ikan yang digunakan yaitu sampel yang sudah tersedia milik laboratorium BRPPUPP Palembang. Bagian sampel yang diekstraksi yaitu pada bagian sirip ikan menggunakan metode tahap standar Genomic DNA Mini Kit. Hasil penelitian yaitu didapatkan DNA murni yang membentuk struktur fiber dan berbentuk pellet yang telah melalui serangkaian proses peripitasi dan sentrifugasi. Ekstrak DNA yang telah



diperoleh dan telarut dalam larutan buffer, selanjutnya disimpan didalam freezer dengan suhu sekitar -20°C , bertujuan agar sampel DNA yang telah diekstraksi dapat disimpan hingga waktu berminggu-minggu. Dari hasil yang didapatkan maka disimpulkan bahwa ekstraksi DNA berguna dalam mendapatkan DNA murni.

Kata kunci: Teknik Ekstraksi; DNA; Jaringan; Ikan Sidat; Genomic DNA Mini Kit

PENDAHULUAN

Molekul DNA dalam suatu sel dapat diekstraksi atau diisolasi untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis [6]. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat 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. Salah satu prinsip isolasi yaitu dengan sentrifugasi [8]. Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada dibagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah [1].

Ekstraksi DNA adalah proses dan tahapan pertama yang dilakukan untuk mendapatkan total DNA dari suatu biota [6]. Secara umum, ekstraksi DNA meliputi beberapa tahapan proses penting, yaitu dari mulai tahap persiapan hingga akhirnya diperoleh ekstrak DNA yang terlarut dalam suatu larutan penyangga (*buffer*) khusus. Larutan tersebut digunakan untuk menyimpan dan mempertahankan kondisi DNA secara kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif lama. Secara kualitatif, berarti larutan penyangga tersebut harus dapat mempertahankan kualitas DNA yang terlarut tetap dalam kondisi baik. Sedangkan secara kuantitatif berarti larutan penyangga tersebut harus mampu mempertahankan jumlah DNA yang terlarut, sehingga jumlahnya tetap (tidak terdegradasi/rusak) dan cukup untuk digunakan dalam tahapan selanjutnya tanpa mengalami penurunan kualitas maupun kuantitas DNA terlarut.

Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA [6]. Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik konvensional maupun menggunakan kit [11]. Ekstraksi DNA secara konvensional bisa dilakukan antara lain dengan metode (CsCl/EtBr). Metode Genomic DNA Mini Kit mempunyai kelebihan dapat mempercepat proses ekstraksi dan DNA yang dihasilkan lebih bersih dan lebih terkonsentrasi. Sedangkan metode konvensional memiliki kelebihan harga yang lebih murah tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama serta senyawa EtBr yang terkandung memiliki zat yang berbahaya.

Ikan Sidat merupakan familia dari Anguillidae, memiliki pola hidup katadromous yaitu ikan yang bermigrasi dari perairan tawar ke perairan laut. Ikan sidat memijah di laut, menghasilkan larva (*leptocephalus*), dan terbawa oleh turbulensi arus ke arah tepi laut [9]. *Leptocephalus* berkembang menjadi *glass eels* dan mulai memasuki daerah sungai atau estuari. Kemudian berkembang menjadi *elvers* yang mulai memiliki perubahan pigmen tubuh. *Elvers* berkembang menjadi *yellow eels*. Selama pematangan, ikan sidat berkembang menjadi *silver eels* dan kembali ke laut untuk memijah dan mati. Ikan sidat tersebar di daerah tropis

maupun sub tropis. Terdapat 22 spesies atau subspecies ikan sidat yang ditemukan di dunia dan sembilan spesies atau subspecies diantaranya terdapat di Indonesia, yaitu *Anguilla bicolor bicolor*, *A. nebulosa nebulosa*, *A. bicolor pacifica*, *A. interioris*, *A. borneensis*, *A. celebesensis*, *A. marmorata*, *A. obseura*, dan *A. megastoma* [7].

Berdasarkan studi referensi, isolasi DNA menggunakan teknik ekstraksi jaringan diduga mampu dapat menghasilkan DNA murni. Oleh sebab itu penelitian mengenai teknik ekstraksi jaringan DNA pada ikan sidat (*Anguilla* sp.) di BRPPUPP Palembang perlu dilakukan. Tujuan dan manfaat pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui cara menghasilkan DNA murni pada ikan sidat melalui teknik ekstraksi jaringan DNA.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

1. Alat

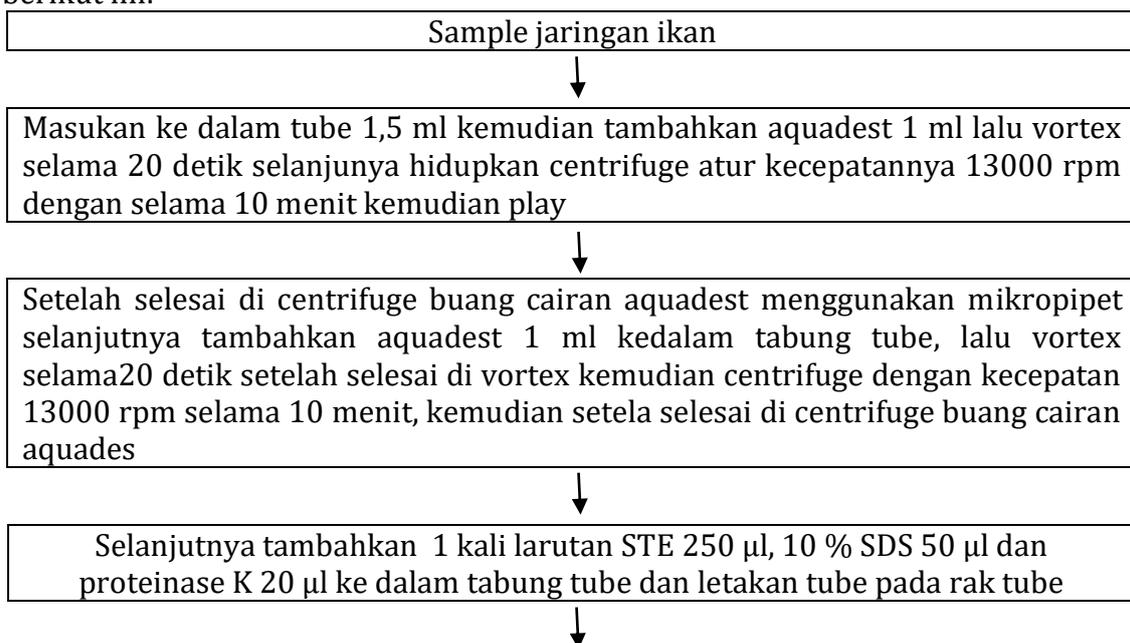
Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu gunting, pinset mikropipet, vortex, incubator, centrifuge, lemari pendingin, gelas reaksi, kamera, spidol, autoklaf, sarung tangan lateks, tisu, tabung tube, kotak tube, rak tube.

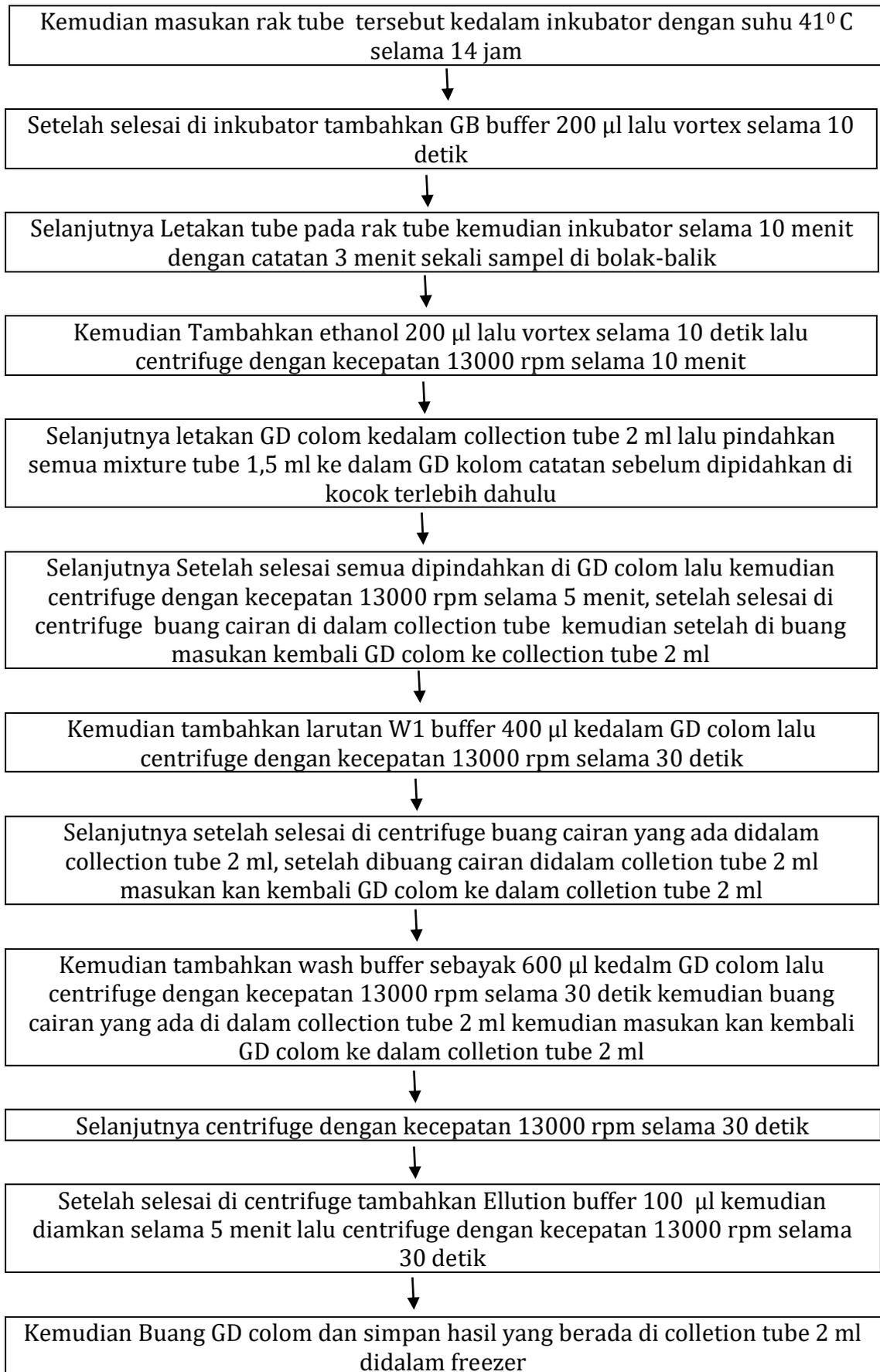
2. Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel ikan sidat family Anguillidae, alkohol, aquades, larutan 1 x STE, larutan 10% SDS, larutan Proteinase K, aquadest H₂O, GB Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, Elution buffer.

Prosedur Ekstraksi DNA

Adapun prosedur ekstraksi DNA pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut ini:





HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik Ekstraksi Jaringan DNA Ikan Sidat (*Anguilla sp.*)

Berdasarkan Kerja Praktek yang telah dilakukan, di Laboratorium Balai Riset Perikanan Perairan Umum dan Penyuluhan Perikanan di Laboratorium Biologi Ikan yakni dilakukan pengamatan dengan menggunakan 10 sampel yang sudah tersedia milik Laboratorium BRPPUPP. Adapun Prosedur melakukan ekstraksi sampel dilakukan sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk ekstraksi sampel



Gambar 1. Persiapan Alat Untuk Ekstraksi DNA

2. Alat dan bahan yang akan digunakan dimasukkan ke dalam Autoclave untuk proses sterilisasi



Gambar 2. Sterilisasi Alat Pada Autoclave

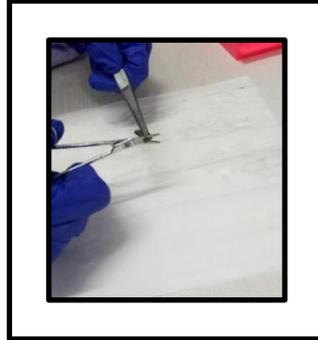
3. Setelah proses sterilisasi, selanjutnya alat-alat di inkubasi pada suhu 41°C selama 14 jam



Gambar 3. Proses Inkubasi Alat-alat

4. Pada ekstraksi sampel bagian yang diambil adalah pada bagian sirip badan ikan. Setelah itu, siapkan dua gelas ukur dan masing-masing gelas ukur tersebut diisi dengan alkohol 70% dan aquades. Kemudian masukkan gunting dan pinset kedalam alkohol untuk mensterilkan, sampel yang sudah disiapkan.

Kemudian diambil sedikit dengan menggunakan gunting dan dijepit dengan pinset dan dicuci kedalam aquades, sebelum dimasukkan kedalam mikrotube terlebih dahulu dikeringanginkan dengan tisu dan dimasukkan kedalam mikrotube ukuran 1.5 ml.



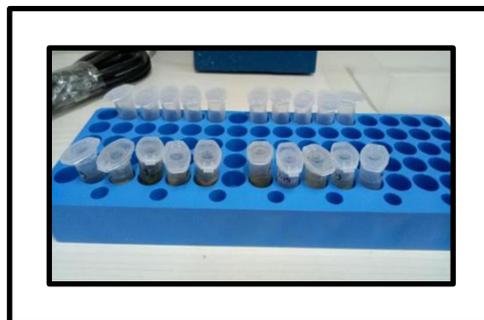
Gambar 4. Pengambilan Jaringan Pada Sirip Ikan

5. Selanjutnya tambahkan aquadest 1 ml, lalu divortex selama 20 detik dan di centrifuge 13.000 rpm selama 10 menit. Setelah itu aquadest yang terdapat dalam tube dibuang, dan ulangi langkah tersebut 1 kali lagi.



Gambar 5. Sample di Vortex Gambar 6. Sample di Sentrifuge

6. Setelah itu sampel yang akan digunakan diberi nomor terlebih dahulu disesuaikan dengan penomoran dari sampel yang digunakan, nomor dari sampel dituliskan pada setiap mikrotube yang digunakan.



Gambar 7. Penomoran Sample Pada Mikrotube

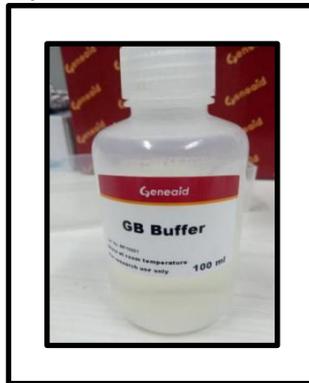
7. Setelah sampel dimasukkan kedalam mikrotube ditambahkan larutan 1 x STE 250 μ l, dan 10 % SDS 50 μ l, serta tambahkan larutan Proteinase K 20 μ l dan pastikan pada saat memasukkan larutan tidak mengenai sampel agar tidak terkontaminasi. Kemudian tutup rapat semua sampel dan di vortex satu

persatu untuk mencampurkan semua bahan. Setelah itu, masukkan kedalam inkubator pada suhu 41°C selama 14 jam.



Gambar 8. Proses Inkubasi Sample

- Setelah selesai proses inkubasi keluarkan sampel dari inkubator dan setiap sampel ditambahkan 200 μ L GB buffer dan di vortex selama 10 detik. Selanjutnya letakkan tube-tube diatas hotplate selama 10menit (selama 3 menit sampel di bolak-balik).



Gambar 9. Penambahan GB Buffer

- Kemudian tambahkan ethanol 200 μ l, vortex 10 detik lalu centrifuge 13.000 rpm selama 10 menit. Lalu letakkan GD column ke dalam collection tube 2 ml. Pindahkan semua mixture dalam tube 1,5 ml ke GD column dan dikocok sebelum dipindah. Centrifuge lagi 13.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya buang cairan dalam tube 2 ml.



Gambar 10. Proses Pembuangan Cairan Dalam Tube

- Masukkan kembali GD column ke collection tube 2 ml. Lalu tambahkan W1 buffer 400 μ l dan di centrifuge 13.000 rpm 30 detik.



Gambar 11. Penambahan W1 Buffer

11. Buang cairan dalam collection tube 2 ml, lalu masukkan kembali GD column ke collection tube 2 ml. Selanjutnya tambahkan Wash buffer 600 μ l dan di centrifuge 13.000 rpm 30 detik.



Gambar 12. Penambahan Wash Buffer

12. Buang collection tube 2 ml dan letakkan GD column dalam tube 1,5 ml. Lalu tambahkan Ellution buffer 100 μ l, diamkan selama 5 menit, dan centrifuge 13.000 rpm selama 30 detik.



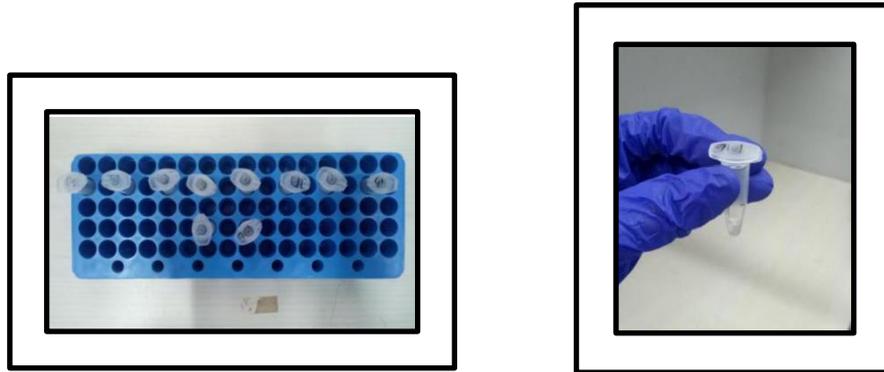
Gambar 13. Penambahan Ellution Buffer

13. Buang GD column dan simpan hasil ekstraksi dalam freezer



Gambar 14. Penyimpanan Hasil Ekstraksi Dalam Freezer

14. Hasil ekstraksi jaringan DNA Ikan Sidat



Gambar 15. Hasil Ekstraksi Jaringan DNA Ikan Sidat

PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA merupakan teknik analisis biologi molekular untuk mendapatkan hasil yang akurat. Uji kualitatif DNA diawali dengan isolasi DNA dengan tujuan untuk mengeluarkan DNA dari inti sel [3]. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam kajian ilmu hayati tidak terlepas dari analisis tingkat seluler dan molekuler [4]. Dalam praktek ini ditunjukkan ekstraksi jaringan dan isolasi DNA yang dilanjutkan dengan tahapan amplifikasi hingga elektroforesis sebagai metode analisis sekuen DNA. Namun pada kesempatan ini hanya dicukupkan pada tahap isolasi DNA dengan menggunakan sampel milik Laboratorium Riset Penelitian Perikanan Perairan Umum dan Penyuluhan Perikanan.

Sebelum masuk dalam proses ekstraksi DNA, sampel biota yang diperoleh dari lapangan harus dipersiapkan secara khusus terlebih dahulu. Disarankan, sebaiknya memisahkan sampel menjadi dua bagian, yaitu sampel yang akan diekstrak dan sampel yang akan disimpan sebagai koleksi yang ataupun diproses untuk tujuan yang lain. Sebagai catatan penting, ukuran sampel yang perlu disiapkan untuk analisis DNA rata-rata hanya sekitar 50-100 mg (tergantung tujuan penelitian). Ukuran ini relatif kecil yaitu seukuran 2 bulir beras. Proses pemisahan ini dimaksudkan untuk menjaga kesegaran dan kebersihan sampel, serta meminimalkan resiko kontaminasi dari organisme lain maupun dari berbagai jenis reagen kimia, seperti formalin yang dapat mengganggu proses ekstraksi DNA [4]. Sampel yang telah terpisahkan, selanjutnya disimpan dalam larutan Ethanol (99,99%) atau minimal 96% untuk menjaga kualitas sampel dan kualitas DNA yang akan diekstrak. Proses tersebut dinamakan preservasi sampel untuk ekstraksi DNA [6].

Larutan Ethanol 96%-100% mampu menjaga kestabilan kondisi DNA di dalam sel untuk waktu yang relatif lama [6]. Hal ini disebabkan larutan Ethanol tersebut akan langsung terserap dan mengawetkan DNA yang terdapat di dalam sel dengan cepat, mengingat ukuran sampel yang akan digunakan relatif kecil (30- 50 mg), sehingga kualitas DNANYA dapat terjaga dengan baik. Hal ini tidak dapat dilakukan oleh larutan Ethanol 70%, karena proses penyerapannya relatif lebih lambat yang disebabkan kandungan airnya lebih besar (30%). Selain itu, kandungan air dalam larutan Ethanol 70% yang lebih besar dibandingkan dengan larutan Ethanol 100% atau 96% dapat memicu terjadinya proses pembusukan sampel yang lebih cepat

oleh bakteri resisten alkohol sehingga sampel lebih cepat rusak. Oleh karena itu, larutan Ethanol 70% tidak direkomendasikan untuk digunakan untuk menyimpan sampel organisme yang terkait dengan proses ekstraksi DNA dalam waktu yang relatif lama [10].

Ekstraksi dan isolasi DNA ini dilakukan dengan menggunakan Genomic DNA mini Kit yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan untuk membuang alkohol dari sampel dan menganalisis menggunakan proteinase K. Jaringan direndam dengan aquadest, divortex dan disentrifuge 13.000 rpm selama 10 menit, langkah ini dilakukan sebanyak dua kali pengulangan dilakukan agar sisa-sisa alkohol dapat tercuci bersih. Sampel kemudian dilisis menggunakan 1 x STE, 10% SDS dan proteinase K. Pelisisan ini dilakukan dalam inkubator pada suhu 41^o C selama ± 14 jam sambil dikocok pelan. Tahap berikutnya menggunakan metode tahap standar Genomic DNA Mini Kit.

Proses selanjutnya yaitu pemecahan membran sel menggunakan larutan SDS dengan kadar 10%. Selain berperan melisiskan membran sel, larutan SDS dapat juga berperan dalam mengurangi aktifitas enzim nukleuse yang merupakan enzim pendegrasi DNA [6]. Dalam proses lisis ini juga dibantu dengan penambahan larutan 1 x STE. *Natrium Dedosil Sulfat* merupakan detergen yang mempunyai sifat polar dan non polar dari SDS tersembunyi kedalam bagian non polar dari protein, sedangkan gugus sulfat dari SDS yang bermuatan negatif berhubungan langsung atau terpanjang pada pelarut [4].

Sampel yang telah di inkubator ditambahkan 200 µl GB buffer lalu di vortex. Fungsi larutan buffer adalah untuk menjaga struktur DNA selama proses penghancuran dan perifikasi sehingga memudahkan dalam menghilangkan protein DNA dan RNA serta mencegah aktifitas enzim pendegrasi DNA dan pencegahan perubahan pada molekul DNA. Untuk mengoptimalkan fungsi larutan buffer dibutuhkan konsentrasi, pH dan kekuatan ion penambahan inhibitor DNAase dan detergen. Konsentrasi dan pH 5 sampai 12. Larutan buffer dengan pH rendah akan mengakibatkan depurifikasi dan mengakibatkan DNA terdistribusi di fase fenol selama proses deprotenasi. Sedangkan pH larutan yang tinggi diatas 12 akan mengakibatkan pemisahan untai ganda DNA.

Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada dua yaitu sentrifuge dan peripitasi. Dari sentrifugasi diperoleh dua lapis larutan. Hasil sentrifugasi menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah [3]. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugasi sehingga substansi yang lebih besar akan berada didasar, sedangkan substansi ringan akan tertarik keatas [5]. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan didalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan bervariasi, dalam prosedur digunakan 13.000 rpm.

DNA yang telah di ekstraksi dari dalam sel selanjutnya perlu dipisahkan dari kontaminan komponen penyusun lainnya seperti polisakarida dan protein agar DNA yang didapat memiliki kemurnian yang tinggi proses ini menggunakan ethanol absolut. Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dapat dipekatkan melalui presipitasi. Pada umumnya digunakan etanol atau isopropanol dalam tahapan presipitasi. Kedua senyawa tersebut akan mempresipitasi DNA pada fase aquoeus sehingga DNA menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukan sentrifugasi [6].



Setelah ekstrak DNA didapatkan, tahap selanjutnya adalah penyimpanan ekstrak DNA. Ekstrak DNA yang telah diperoleh dan telarut dalam larutan buffer, selanjutnya disimpan didalam freezer dengan suhu sekitar -20°C . Penyimpanan hasil ekstraksi pada suhu -20°C bertujuan agar sampel DNA yang telah diekstraksi dapat disimpan hingga waktu berminggu-minggu. Semakin rendah temperatur didalam freezer, maka ekstrak DNA semakin lama dapat disimpan[6]. Adapun suhu ideal untuk penyimpanan ekstrak DNA yaitu 70°C . Pelarutan kembali dengan buffer TE juga dapat memisahkan antara RNA yang mempunyai berat molekul lebih rendah dibandingkan DNA sehingga DNA yang didapatkan tidak terkontaminasi oleh RNA.

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian menunjukkan terdapat dua macam fraksi yang terpisah yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah yang merupakan DNA menggumpal berbentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukannya sentrifugasi. Hal ini membuktikan bahwa DNA murni dapat dihasilkan dari teknik ekstraksi DNA jaringan menggunakan metode Genomic Mini Kit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini. Terutama Balai Riset Perikanan dan Penyuluhan Perikanan (BRPPUPP), serta kepada Ibu Ike Trismawanti dan Bapak Awalul Fatiqin sebagai pembimbing.

Daftar Rujukan

- [1] Bettelheim, F. dan Landersberg, J. 2007. *Laboratory Experiments For General, Organic, and Biochemistry*. Chaput: J.C.
- [2] Budi, B.S. 2012. *Isolasi DNA*. Jakarta: Erlangga.
- [3] Campbell. 2012. *Buku Ajar Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- [4] Fachtiyah, A., dan Rahayu. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- [5] Kimball, J.W. 2013. *Biologi Edisi Kelima*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [6] Marwayana, O.N. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) Dari Sampel Jaringan Otot. *Jurnal Oseana*. Volume. XL. No. 2. Hal. 1-9.
- [7] Rachmat. 2012. *Isolasi DNA*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [8] Ndobe, S., Serdiata, N., dkk. 2019. Identifikasi Jenis Glass Eel Ikan Sidat (*Anguilla* sp.) yang Beruaya Anadromous di Sungai Palu. *Jurnal Research Gate. Prosiding Seminar Nasional XXI/ PBI*.
- [9] Sarwono, B. 2007. *Budidaya Belut dan Sidat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [10] Wulandhari, A. 2009. Optimalisasi Hasil Ekstraksi DNA Dari Darah Sapi Segar Menggunakan Hight Salt Method Dengan Perbandingan Darah dan Lisis Buffer Pada Kecepatan Sentrifuge Berbeda. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor: hlm 31.
- [11] Yuwono, T. 2005. *Teori dan Aplikasi PCR*. Yogyakarta: Erlangga.