

ISOLASI DAN PEMURNIAN DNA/RNA

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah mempelajari ini mahasiswa diharapkan dapat:

1. Menjelaskan pengertian isolasi DNA dari berbagai ahli
2. Menjelaskan prinsip dasar isolasi DNA
3. Melakukan isolasi DNA
4. Menganalisis hasil isolasi DNA

B. Pengertian Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah proses memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen lain yang menyusun sel. Sumber DNA bisa dari tanaman, sel hewan, sel tumbuhan atau mikroorganisme. Metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA sebagai berikut: enzim digestion, alkaline lysis, mechanical lysis dan lysis dengan deterjen. Ada beberapa pengertian menurut para ahli:

1. Sambrook & Russell (2001)

Isolasi DNA didefinisikan sebagai serangkaian prosedur untuk memecah sel, melepaskan DNA, serta memurnikannya dari protein, lipid, dan metabolit lain agar dapat digunakan dalam analisis molekuler.

2. Alberts et al (2014)

Isolasi DNA adalah langkah dasar dalam biologi molekuler yang bertujuan menyiapkan DNA murni dari jaringan biologis, yang diperlukan untuk studi struktur gen, replikasi, ekspresi, dan manipulasi genetik.

3. Brown (2016)

Isolasi DNA merupakan tahap awal penting dalam hampir semua teknik rekayasa genetika, karena keberhasilan analisis seperti PCR, sekuensing, dan kloning sangat bergantung pada kualitas DNA yang diperoleh.

4. Wilson dan Walker (2018)

Isolasi DNA adalah proses esensial yang menggabungkan teknik biokimia dan fisik untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi dari berbagai sumber biologis (sel darah, tanaman, mikroba, dll).

Prinsip dasar isolasi DNA adalah lisis sel (melisis DNA dari nucleus), menghilangkan protein dan RNA, pengendapan DNA/presipitasi DNA, pencucian DNA dari protein dan DNA (kontaminan) dan pemanenan DNA. Tujuan dilakukan isolasi DNA adalah diperolehnya DNA (genome) dengan konsentrasi tinggi dan bersih dari kontaminan. Berbagai teknik dasar untuk ekstraksi DNA telah dikembangkan. Isolasi DNA dapat dilakukan secara manual dan dengan bantuan KIT. Kedua cara tersebut memiliki prinsip dasar yang sama.

Untuk memperoleh isolate DNA dari sampel yang diekstraksi, ada beberapa hal yang harus diperhatikan dengan benar yaitu;

1. Tahapan pemecahan dinding sel atau jaringan yang akan diisolasi DNA-nya. Seperti: sel darah merah dan jaringan hewann. Jaringan hewan dapat dipecah dengan dua cara yaitu:
 - o Secara fisik: sel pecah dengan kekuatan mekanik

- Secara kimiawi: sel dirusak dengan buffer lisis sel yang berfungsi untuk merusak integrase barrier dinding sel

Contoh senyawa kimia yang digunakan untuk penghancuran sel adalah EDTA dan SDS. EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan integrase sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuclease yang merusak asam nukleat). SDS merupakan sejenis detergen yang berfungsi merusak membrane sel.

2. Debris sel dipisahkan dari larutan DNA
3. Presipitasi RNA dan protein agar diperoleh DNA yang murni
4. Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan etanol 96% dingin atau dengan isopropanol
5. Pemurnian DNA dari debris sel dengan pemberian fenol, fenol: kloroform, fenol: kloroform: isoamyl alcohol atau jika menggunakan kit eksraksi DNA tahap ini dilakukan dengan penambahan wash buffer.
6. Pemurnian DNA dari protein, digunakan enzim protease yaitu proteinase K, dan pemurnian dari kontaminan RNA ditambahkan dengan RNAase.
7. Presipitasi akhir DNA dapat dilakukan dengan menggunakan etanol dingin kemudian dilanjutkan dengan pencucian menggunakan etanol 70%.
8. Melarutkan DNA dengan penambahan buffer TE atau buffer BE (jika menggunakan kit).

Isolasi DNA dari jaringan yang dilakukan secara manual dapat mengikuti prosedur isolasi DNA karangan Sambrook et al, 1989. Berbagai bentuk kit telah dirancang oleh produsen untuk memudahkan peneliti dalam mengeksraksi DNA. Hasil eksraksi DNA merupakan tahapan penting untuk dilanjutkan ke proses analisis DNA selanjutnya. Oleh karena itu, pelaksanaan ekstraksi DNA harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminan.

C. Faktor-Faktor yang mempengaruhi Isolasi DNA

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses isolasi DNA adalah:

1. Kualitas dan Jenis Sampel
Kondisi awal sampel sangat menentukan keberhasilan isolasi. Sampel yang segar biasanya menghasilkan DNA/RNA dengan kualitas lebih baik dibanding sampel yang disimpan lama tanpa buffer pengawet. Jaringan tumbuhan yang kaya polisakarida dan polifenol dapat mengganggu pemurnian DNA karena senyawa tersebut ikut terpresipitasi dan menghambat reaksi PCR atau enzimatis (Wilson & Walker, 2018)
2. Metode lisis sel
Efektivitas tahap lisis memengaruhi jumlah DNA/RNA yang dilepaskan. Lisis dapat dilakukan secara fisik (freeze-thaw, grinding), kimia (detergen seperti SDS, CTAB), atau enzimatis (proteinase K, lysozyme). Pemilihan metode bergantung pada jenis organisme: bakteri Gram-positif lebih sulit dilisis dibanding Gram-negatif, sedangkan sel tanaman membutuhkan metode mekanis lebih kuat karena dinding sel yang keras (Sambrook & Russell, 2001).
3. Keberadaan nukleose
DNA mudah terdegradasi oleh DNase, sedangkan RNA sangat rentan terhadap RNase.

RNase secara alami sangat stabil bahkan tahan panas, sehingga pencegahan degradasi RNA menjadi tantangan besar. Penggunaan bahan kimia seperti guanidinium isothiocyanate dan DEPC-treated water diperlukan untuk menonaktifkan RNase (Chomczynski & Sacchi, 1987).

4. Kontaminan non-nukleat

Protein, polisakarida, lipid, dan polifenol dapat ikut terbawa dalam isolasi dan mengganggu kemurnian. Kontaminan ini dapat diatasi melalui penggunaan buffer fenol-kloroform, kolom silika, atau magnetic beads yang secara selektif mengikat DNA/RNA. Rasio A260/A280 di bawah 1,8 biasanya menandakan kontaminasi protein, sedangkan rasio A260/A230 rendah menunjukkan adanya kontaminan organik seperti fenol atau karbohidrat (Wilfinger et al., 1997).

5. Metode dan kit yang digunakan

Pemilihan metode (manual vs. kit komersial) memengaruhi kualitas hasil. Kit berbasis kolom silika menghasilkan DNA/RNA murni dengan cepat, tetapi harganya mahal. Metode tradisional seperti fenol-kloroform lebih murah, namun berisiko membawa kontaminan kimia jika tidak dilakukan dengan benar (Brown, 2016).

6. Penyimpanan dan stabilitas DNA/RNA

Penyimpanan DNA dalam buffer TE atau air bebas nuklease pada suhu -20 °C atau -80 °C dapat menjaga integritasnya. RNA sebaiknya disimpan dalam larutan RNA stabilization reagent atau dalam bentuk cDNA untuk jangka panjang karena sifatnya yang sangat rapuh (Alberts et al., 2014).

7. Suhu

Suhu memegang peran penting dalam menjaga stabilitas DNA maupun RNA.

- DNA relatif stabil pada suhu rendah, tetapi suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi heliks ganda menjadi rantai tunggal. Pada RNA, degradasi lebih cepat terjadi, sehingga penyimpanan harus dilakukan pada suhu -80 °C atau dalam nitrogen cair.
- Proses isolasi biasanya dilakukan pada suhu dingin (di atas es) untuk mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merusak DNA/RNA.
- Penggunaan buffer dingin saat ekstraksi terbukti menekan degradasi nukleat (Wilson & Walker, 2018).

8. PH

pH berpengaruh langsung pada muatan dan stabilitas DNA/RNA.

- pH netral (sekitar 7,0–8,0) diperlukan untuk menjaga ikatan hidrogen antar basa nitrogen tetap stabil.
- Pada pH asam, DNA dapat mengalami depurinasi (hilangnya basa purin) yang merusak integritas molekul.
- Sebaliknya, pH terlalu basa dapat menyebabkan denaturasi heliks ganda. RNA juga lebih rapuh pada kondisi basa karena ikatan fosfodiester lebih mudah terhidrolisis (Alberts et al., 2014).

9. Kosentrasi elektrolit

Kation seperti Na^+ , K^+ , dan Mg^{2+} berperan menstabilkan muatan negatif dari tulang punggung fosfat DNA/RNA.

- Konsentrasi elektrolit yang tepat membantu pengendapan DNA dengan etanol/isopropanol, di mana ion Na^+ atau NH_4^+ diperlukan agar DNA dapat mengendap.
- Kekurangan ion dapat membuat DNA gagal mengendap, sedangkan kelebihan ion dapat meninggalkan garam sebagai kontaminan yang mengganggu PCR atau enzim restriksi (Sambrook & Russell, 2001).
- Oleh karena itu, pencucian DNA biasanya menggunakan etanol 70% untuk menghilangkan kelebihan garam.

10. Perbandingan basa nitrogen

Komposisi basa nitrogen, khususnya perbandingan Guanin-Sitosin (GC content), berpengaruh pada stabilitas DNA.

- DNA dengan kandungan GC tinggi lebih stabil karena adanya tiga ikatan hidrogen pada pasangan GC dibanding hanya dua pada AT.
- Kandungan GC yang tinggi membuat DNA lebih sulit terdenaturasi, sehingga metode isolasi yang menggunakan panas (misalnya lisis termal) bisa kurang efektif.
- Pada organisme tertentu (misalnya bakteri dengan GC tinggi), sering dibutuhkan perlakuan tambahan untuk melisik DNA (Brown, 2016).

D. Teknik Isolasi DNA/RNA

Isolasi DNA merupakan langkah fundamental dalam biologi molekuler untuk memperoleh DNA yang murni dari sel atau jaringan, dengan kualitas dan kuantitas memadai agar dapat digunakan dalam berbagai aplikasi seperti PCR, sekuensing, dan kloning. Proses isolasi umumnya terdiri atas tiga tahap utama: (1) lisis sel, (2) pemisahan DNA dari kontaminan, dan (3) pemurnian serta presipitasi DNA

1. Lisis Sel

Tahap awal isolasi DNA adalah pemecahan membran sel untuk melepaskan isi sel.

- Metode fisik: grinding (penghancuran mekanis), freeze-thaw, sonikasi. Cocok untuk jaringan keras (tanaman, jamur).
- Metode kimia: penggunaan deterjen seperti SDS (sodium dodecyl sulfate) atau CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) yang melarutkan membran lipid dan protein.
- Metode enzimatis: lysozyme (untuk bakteri), proteinase K (menghancurkan protein), RNase (menghilangkan RNA).

1. Pemisahan DNA dari Kontaminan

Setelah sel dilisis, DNA bercampur dengan protein, lipid, polisakarida, dan RNA. Teknik pemisahan dilakukan dengan beberapa pendekatan:

- Ekstraksi Organik (Feno-Klorofom)

1. Prinsip: protein terdenaturasi oleh fenol dan larut dalam fase organik, sedangkan DNA tetap berada pada fase air.
2. Langkah: penambahan fenol:kloroform:isoamil alkohol → sentrifugasi → DNA di fase atas (air).
3. Kelebihan: menghasilkan DNA berkualitas tinggi.

4. Kekurangan: penggunaan pelarut organik berbahaya dan memakan waktu (Sambrook & Russell, 2001)
 - Metode CTAB
 5. Digunakan untuk jaringan tanaman yang kaya polisakarida dan polifenol.
 6. CTAB mengikat polisakarida sehingga dapat dipisahkan dari DNA.
 7. Umumnya dipadukan dengan presipitasi etanol/isopropanol (Porebski et al., 1997).
 - Metode Kolom Silika (Silica Membrane)
 8. Prinsip: DNA berikatan dengan membran silika dalam kondisi garam chaotropic tinggi (misalnya guanidinium).
 9. Tahap: ikatan DNA-silika → pencucian → elusi dengan buffer rendah garam atau air.
 10. Kelebihan: cepat, aman, hasil sangat murni.
 11. Kekurangan: biaya lebih mahal dibanding metode manual (Boom et al., 1990).
 - Magnetic Bead-Based Extraction
 12. Prinsip: DNA berikatan dengan partikel magnetik yang dilapisi silika.
 13. Tahap: ikatan DNA-beads → pencucian dengan magnet → elusi DNA.
 14. Kelebihan: lebih praktis, cocok untuk high throughput dan otomatisasi.
 15. Kekurangan: memerlukan perangkat tambahan (Hawkins et al., 1994).
2. Pemurnian Serta Presipitasi DNA

DNA yang telah dipisahkan kemudian dimurnikan dengan cara presipitasi.

 - Etanol/Isopropanol Precipitation: penambahan garam (NaOAc atau NH_4OAc) untuk menetralkan muatan DNA, kemudian DNA dipresipitasi dengan etanol dingin.
 - DNA yang mengendap dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan garam, lalu dilarutkan kembali dalam air bebas nuklease atau buffer TE.
 - Kemurnian diperiksa dengan spektrofotometri (A_{260}/A_{280}) dan integritas diperiksa dengan elektroforesis (Wilfinger et al., 1997).

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction* (7th ed.). Wiley-Blackwell.

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Hawkins, T. L., O'Connor-Morin, T., Roy, A., & Santillan, C. (1994). DNA purification and isolation using magnetic particles. *Nucleic Acids Research*, 22(21), 4543–4544. <https://doi.org/10.1093/nar/22.21.4543>
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., Krug, D. E., & Ertel, A. N. (1997). RNA integrity number and standardization of RNA quality assessment. *Nature Methods*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2468>
- Wilson, K., & Walker, J. (2018). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (8th ed.). Cambridge University Press.