

Perbandingan Metode Ekstraksi DNA *Collocalia fuciphaga* Secara Manual dan Kit dari Berbagai Sumber Material Genetik

Comparison of Manual and Commercial Kit Methods for DNA Extraction of *Collocalia fuciphaga* Using Different Genetic Materials

Hendra*, Cellica Riyanto, Aditya Fendy Heryanto, Pramana Yuda

Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Jln. Babarsari No. 44 Yogyakarta 55281

Email: hendrachrissevand@gmail.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The aim of this research was to compare DNA extraction protocols of PCE and extraction kit using different genetic material sources of blood and feathers. Three different extraction buffers of PCE method were used. This study suggested that PCE method was more efficient than the extraction kit method. Meanwhile, extraction buffer of Bello was more efficient for extracting DNA from feather, while extraction buffer of Khosravina was more efficient for extracting DNA from blood. Wing feather was a suitable sample as genetic source for DNA extraction.

Keywords: DNA extraction, phenol-chloroform, *Collocalia fuciphaga*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan membandingkan metode PCE dengan kit ekstraksi dalam mengekstrak DNA berbagai material sumber genetik, yaitu darah dan bulu *Collocalia fuciphaga*. Ekstraksi metode PCE menggunakan tiga jenis buffer yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi DNA menggunakan metode PCE lebih efisien dibandingkan kit ekstraksi. Buffer ekstraksi Bello lebih efisien untuk ekstraksi DNA sampel bulu, sedangkan buffer ekstraksi Khosravina lebih efisien untuk ekstraksi DNA sampel darah. Penelitian ini juga menunjukkan bulu sayap merupakan sumber genetik yang paling baik untuk ekstraksi DNA.

Kata kunci: ekstraksi DNA, phenol-chloroform, *Collocalia fuciphaga*

Diterima: 8 November 2013, disetujui: 17 Februari 2014

Pendahuluan

Burung walet telah banyak dimanfaatkan oleh manusia untuk diambil sarangnya sebagai obat dan bahan makanan (Adiwicaksana, 2006), sehingga banyak dibudidayakan dalam rumah walet. Kegiatan budidaya ini dapat memengaruhi ekosistem karena burung walet termasuk spesies kunci pada habitat alamnya yaitu goa. Kemelimpahan populasi walet di habitat buatan kurang diimbangi dengan penelitian. Penelitian untuk kepentingan konservasi dan ekologi populasi selama ini lebih banyak dilakukan secara konvensional, metode tersebut kurang efektif untuk spesies yang memiliki jarak jelajah yang luas seperti burung walet yaitu 25–40 km (Mardiastuti *dkk.*, 1998).

Pendekatan molekuler menjadi solusi untuk konservasi dan ekologi yang tidak bisa terjawab dengan metode konvensional. Metode ekstraksi merupakan tahap awal yang paling penting dalam penelitian molekuler. Penelitian molekuler saat ini banyak ditawarkan produk komersial, harganya relatif lebih mahal jika dibandingkan dengan diracik sendiri bahannya di dalam laboratorium. Metode molekuler yang lebih murah, salah satunya yaitu metode *phenol chloroform extraction* (PCE). Metode ini memiliki kelemahan dalam hal konsistensi hasil ekstraksi. Oleh karena itu, perlu adanya optimalisasi metode PCE terhadap berbagai sumber material genetik yang sering digunakan pada spesies *Collocalia fuciphaga*.

Penelitian ini bertujuan membandingkan metode ekstraksi DNA dengan peracikan

sendiri (PCE) dan commercial kit. Tiga jenis buffer ekstraksi (buffer ekstraksi dalam metode PCE standar di laboratorium Biomolekuler Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta, buffer ekstraksi menurut Bello dkk., dan buffer ekstraksi menurut Khosravinia dkk., dibandingkan dengan ekstraksi DNA menggunakan kit komersial. Selain itu, dua sumber materi genetik, yaitu darah dan bulu juga dibandingkan. Hasil penelitian ini diharapkan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya yang menggunakan burung walet sebagai objek penelitiannya.

Metode Penelitian

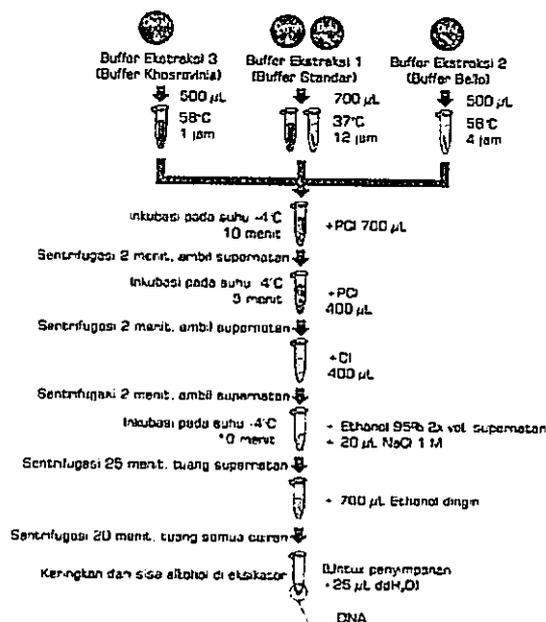
Bahan

Bahan utama yang digunakan yaitu *DNEasy Extraction Kit* dari Qiagen, *phenol:chloroform:isoamyl* (25:24:1); *chloroform:isoamyl* (24:1); 700µl buffer ekstraksi 1 (terdiri dari 100mM Tris-HCl pH 8; 5mM EDTA pH 8; 100mM NaCl dan 0,5% SDS pH 7); 500µl buffer ekstraksi 2 berdasarkan penelitian Bello (2001) (terdiri dari 50mM Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA; 2% SDS; 175µg/ml Proteinase K); dan 500µl buffer ekstraksi 3 merupakan modifikasi dari Khosravinia dkk., (2007) (terdiri dari 5M NaCl; 1M Tris pH 8; 0,5 M EDTA; 10% SDS; 3µg/ml Proteinase K).

Sampel darah dan bulu burung walet dikoleksi dari kota Airmolek, Riau. Proses ekstraksi DNA dan uji kualitatif hasil ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY), sedangkan uji kuantitatif hasil ekstraksi DNA diperoleh dari hasil pengujian di Fakultas Kedokteran Umum, Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Gadjah Mada.

Sampel darah diambil dengan jarum suntik 26G pada vena jugularis burung dan disimpan dalam *Queen's Lysis Buffer* (Seutin dkk., 1991). Bulu dikoleksi dari bulu sayap dan bulu dada. Bagian sayap dan dada burung walet sebelum dicabut dibersihkan terlebih dahulu dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. Bulu terkoleksi disimpan dalam plastik (diberi label). Tahapan ekstraksi metode PCE dengan berbagai buffer ekstraksi ditunjukkan pada Gambar 1.

Hasil ekstraksi DNA dari ketiga jenis buffer dengan *extraction kit* dibandingkan dengan cara dielektroforesis dalam gel agarosa (1% dalam TBE buffer) selama 23 menit pada tegangan 100 volt. Hasil kuantitatif diperoleh dengan *spectrophotometer* (*GeneQuant*) pada panjang gelombang 260/280 nm. Data yang diperoleh berupa rasio, konsentrasi DNA (µg/ml) dan protein (mg/ml) dari setiap sampel.



Gambar 1. Tahapan ekstraksi dengan metode PCE

Hasil dan Pembahasan

Visualisasi gel elektroforesis hasil ekstraksi DNA (Gambar 2) menunjukkan bahwa ekstraksi dengan metode PCE menggunakan buffer ekstraksi 1, 2, dan 3 sama baiknya jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi menggunakan kit komersial. Hal ini ditunjukkan oleh pita DNA yang tampak jelas pada hasil elektroforesis dari kedua metode ekstraksi (manual dan kit komersial).

Namun, hasil kuantifikasi DNA pada volume sampel yang sama, konsentrasi DNA hasil ekstraksi menggunakan metode PCE lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi DNA hasil ekstraksi menggunakan *extraction kit*. Namun, kadar kontaminan berupa protein dari hasil ekstraksi menggunakan *extraction kit* jauh lebih rendah, lihat Tabel 1 (Kuantifikasi DNA Hasil Ekstraksi dengan *DNEasy Extraction Kit*), Tabel 2 (Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi dengan buffer standar), Tabel 3 (Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi dengan buffer Bello) dan Tabel 4 (Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi dengan buffer Khosravinia). Hasil ini menunjukkan kelebihan metode PCE apabila kemurnian DNA tidak menjadi faktor utama dalam kegiatan riset berikutnya. Selain konsentrasi DNA yang lebih tinggi, biaya yang diperlukan untuk metode PCE lebih murah. Oleh karena itu, metode PCE lebih cocok digunakan untuk penelitian yang tidak membutuhkan kemurnian DNA yang tinggi, seperti pemetaan genetik, teknologi marker, dan DNA *sequencing* (Wulandhari, 2009).

Hasil kuantifikasi DNA (Tabel 1) menunjukkan bahwa sampel QS1 dan QSY2 memiliki rasio tinggi ($> 2,0$). Hasil tersebut mengindikasikan adanya kontaminan RNA pada hasil ekstraksi DNA (Khosravinia *dkk.*, 2007). Sebaliknya, sampel QD1 dan QSY1 memiliki rasio yang rendah, karena konsentrasi DNA-nya juga rendah. Rasio OD_{260}/OD_{280} sampel QA1 (darah segar) menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang baik (1,8–2,0).

Tingkat kemurnian DNA berkorelasi dengan kualitas DNA. Kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD_{260} dan nilai OD_{280} pada sampel DNA yang diukur dengan spektrofotometer. DNA dapat dikatakan murni jika rasio

OD_{260}/OD_{280} (*optical density*) berkisar antara 1,8–2,0 (Muladno, 2002). Apabila rasio kurang dari 1,8 dianggap kurang murni karena adanya kontaminasi fenol atau protein pada hasil ekstraksi (Devereux dan Wilkinson, 2004). Khosravinia *dkk.*, (2007) juga menjelaskan bahwa DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika memiliki rasio $OD_{260}/OD_{280} > 2,0$. Nilai rasio tersebut menunjukkan *DNEasy Extraction Kit* lebih efektif mengekstraksi sampel darah dibandingkan sampel bulu atau jaringan.

Berdasarkan data kuantifikasi yang diperoleh, rasio OD_{260}/OD_{280} dengan buffer ekstraksi 1 untuk sampel bulu (Tabel 2) tidak jauh berbeda dibandingkan rasio OD_{260}/OD_{280} dengan buffer ekstraksi 2 (Tabel 3). Tidak semua sampel yang diekstraksi dengan buffer ekstraksi 1 dan 2 memiliki tingkat kemurnian yang baik. Sebagian besar sampel memiliki rasio kurang dari 1,8 yang berarti terdapat kontaminan berupa protein atau fenol dalam hasil ekstraksi. Sampel BY2.4 (Tabel 3) memiliki rasio lebih dari 2, hal ini menunjukkan adanya kontaminan berupa RNA. Hasil ekstraksi dengan tingkat kemurnian yang baik cenderung memiliki konsentrasi DNA yang tinggi dengan kadar protein (kontaminan) yang rendah. Kedua buffer ekstraksi tersebut tidak jauh berbeda kemampuannya dalam mengekstraksi DNA, namun proses ekstraksi dengan buffer ekstraksi 2 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih singkat dibandingkan buffer ekstraksi 1.

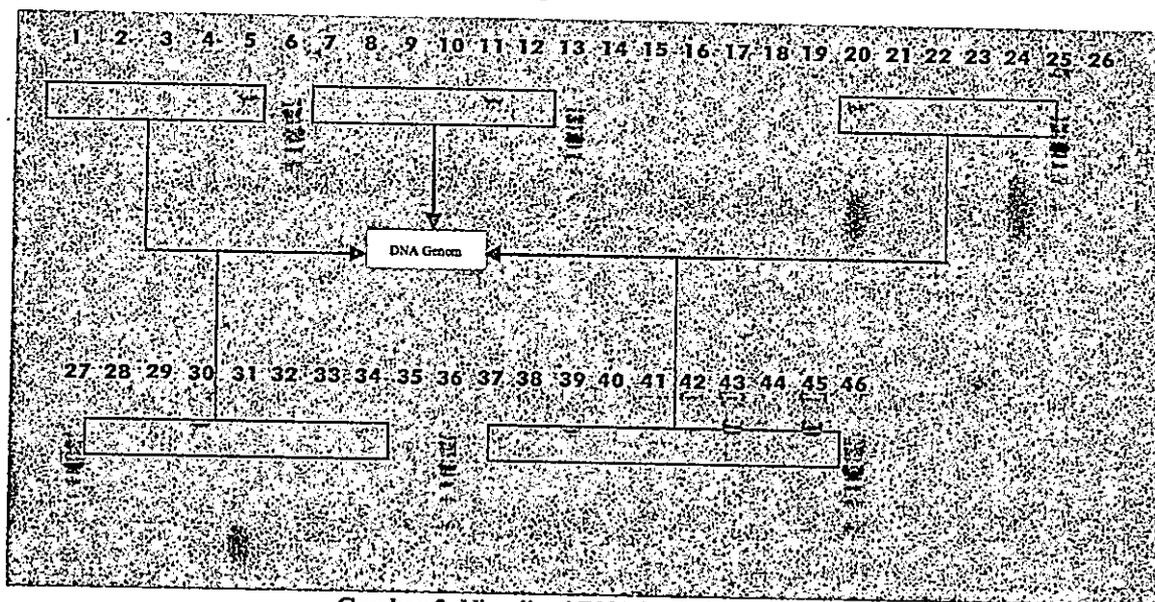
Rasio OD_{260}/OD_{280} dengan buffer ekstraksi 1 untuk sampel darah (Tabel 2) maupun buffer ekstraksi 3 (Tabel 4) menunjukkan rata-rata tingkat kemurnian yang kurang baik. Rata-rata rasio OD_{260}/OD_{280} dengan buffer ekstraksi 1 untuk sampel darah sebesar 1,303; sedangkan rasio OD_{260}/OD_{280} dengan buffer ekstraksi 3 untuk sampel darah sebesar 3,83. Besar kemungkinan terjadi kontaminasi oleh fenol (jika rasio $< 1,8$), karena kadar protein (pengotor) yang terukur rendah dan nilai rasio OD_{260}/OD_{280} juga rendah. Selain fenol, RNA juga merupakan kontaminan yang menyebabkan rasio OD_{260}/OD_{280} tinggi (jika rasio $> 2,0$) (Khosravinia *dkk.*, 2007).

Buffer ekstraksi 3 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih cepat (± 1 jam) dibandingkan dengan buffer ekstraksi 1 (± 18 jam). Hal ini dikarenakan kandungan SDS dan EDTA dalam

buffer ekstraksi 3 cukup tinggi, sehingga proses lisis selnya dapat terjadi lebih efektif.

Berdasarkan data kuantifikasi yang diperoleh, sumber material genetik yang paling baik digunakan adalah sampel bulu sayap. Konsentrasi DNA dari sampel bulu sayap

cenderung tinggi dibandingkan DNA dari sampel lainnya (darah dan bulu dada). Selain itu, kadar kontaminan (protein) juga cenderung rendah, baik pada metode ekstraksi dengan kit maupun metode manual dengan PCE.



Gambar 2. Visualisasi DNA hasil elektroforesis

Tabel 1. Hasil kuantifikasi ekstraksi DNA menggunakan *DNEasy Extraction Kit*

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Protein (mg/ml)
1	QA1	Darah A ₁	1,886	13,9	0
2	QS1	Bulu sayap	3,040	17,4	0
3	QD1	Bulu dada	0,577	0	0
4	QSY1	Bulu sayap	0,113	0,4	0
5	QSY2	Bulu sayap	2,218	4,3	0
Rata-rata			1,567	7,2	0

Tabel 2. Hasil kuantifikasi ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi Standar (Buffer Ekstraksi 1)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Protein (mg/ml)
1	KS	Darah A ₁	1,028	376,4	5,6
2	DS	Darah A ₁	1,021	229,6	3,5
3	A1.4	Darah A ₁	1,549	70,5	0,3
4	A2.4	Darah A ₂	1,158	41,4	0,5
5	A3.4	Darah A ₃	0,957	28,5	0,5
6	A9	Darah A ₉	2,106	32,3	0
Rata-rata			1,303	129,8	1,7
7	BD.3	Bulu dada	1,761	33,6	0,1
8	JPa.3	Bulu dada	1,438	52,1	0,3
9	JPb.3	Bulu dada	1,137	124,3	1,5
10	BS.3	Bulu sayap	1,836	295,9	0,5
11	Hpa	Bulu sayap	1,169	149,7	1,7
12	HPb	Bulu sayap	1,342	121,8	1
13	PY2	Bulu sayap	1,702	35,6	0,1
Rata-rata			1,484	116,1	0,7

Tabel 3. Hasil kuantifikasi ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi Bello (Buffer Ekstraksi 2)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Protein (mg/ml)
1	BA	Bulu sayap	1,88	199,4	0,2
2	Hba	Bulu sayap	1,149	113,0	1,3
3	HBb	Bulu sayap	1,887	260,0	0,3
4	JBa.3	Bulu dada	1,237	89,4	0,9
5	JBb.3	Bulu dada	1,113	113,6	1,4
6	Mba	Bulu sayap	1,229	23,7	0,5
7	MBb	Bulu sayap	1,477	21,4	0,1
8	Nba	Bulu dada	1,068	41,5	0,6
9	NBb	Bulu dada	1,020	20,8	0,3
10	BY ₂	Bulu sayap	1,791	55,2	0,1
11	BY _{2.4}	Bulu sayap	2,236	43,0	0
Rata-rata			1,46	89,18	0,518

Tabel 4. Hasil kuantifikasi ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi Khosravinia (Buffer Ekstraksi 3)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Protein (mg/ml)
1	KA1	Darah A1	5,001	43,7	0
2	KA8	Darah A8	10,337	34,7	0
3	a1.4	Darah A1	1,119	136,0	1,7
4	a2.4	Darah A2	1,094	153,5	2
5	a3.4	Darah A3	1,105	131,8	1,7
6	KB5.4	Darah B5	4,275	30,1	0
Rata-rata			3,82	88,3	0,9

Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode PCE lebih efisien dibandingkan metode *extraction kit*. Buffer ekstraksi Bello lebih efisien untuk mengekstrak DNA dari sampel bulu, sedangkan buffer ekstraksi Khosravinia lebih efisien untuk mengekstrak DNA dari sampel darah. DNA yang berhasil diekstraksi dengan metode PCE dari sumber material genetik bulu sayap lebih baik secara kualitas maupun kuantitas.

Saran

Data mengenai ekstraksi DNA burung walet dari sumber material genetik lain belum dioptimalisasi, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai ekstraksi DNA dengan metode *phenol chloroform extraction* dari sumber material genetik lain, seperti sisa cangkang telur dan feses. Selain itu, perlu dilakukan penambahan RNase pada tahap ekstraksi DNA untuk meningkatkan kemurnian DNA. Penelitian molekuler selanjutnya yang

menggunakan burung (*Collocalia fuciphaga*) sebagai objek penelitiannya, disarankan menggunakan sampel bulu sayap sebagai sumber material genetik, karena selain mudah didapat, pengambilan bulu tidak menyakitkan burung dibandingkan pengambilan sampel darah (*non-invasive sampling*).

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada DITJEN DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui kegiatan PKM-P (Program Kreativitas Mahasiswa - Penelitian) dan kepada Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta (FTB UAJY) atas ijinnya menggunakan sarana dan prasarana di Laboratorium Biologi Molekuler FTB UAJY untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Adiwicaksana. 2006. Pengelolaan Sarang Burung Walet Di Taman Nasional Betung Kerihun Propinsi Kalimantan Barat. *Skripsi*. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Bello, N., Francino, O. dan Sanchez, A. 2001. Isolation of Genomic DNA from Feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13 (2): 162-164.
- Devereux, R. dan Wilkinson, S.S. 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Khosravinia, H., Murthy, H.N.N., Parasad, D.T. dan Pirany, N. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6 (4): 481-486.
- Mardiastuti, A., Mulyani, Y.A., Sugarjito, J., Ginoga, L.N., Maryanto, I., Nugraha, A. dan Ismail. 1998. *Teknik Pengusahaan Walet Rumah, Pemanenan Sarang dan Penanganan Pasca Panen*. Laporan Riset Bidang Teknologi Perlindungan Lingkungan. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor.
- Seutin, G., White, B.N. dan Boag, P.T. 1991. Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analysis. *Canadian Journal of Zoology*. 69: 82-90.
- Wulandhari, A. 2009. Optimalisasi Hasil Ekstraksi DNA dari Darah Segar Sapi Menggunakan *High Salt Method* dengan Perbandingan Darah dan *Lysis Buffer* pada Kecepatan Sentrifugasi Berbeda. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.