

Analisis Perbandingan Kualitas dan Kuantitas DNA Hasil Ekstraksi Dengan Dua Metode Yang Berbeda

Ni Kadek Denita Darma Putri¹, Anisatu Dhimyaty², Shinta Tabina³, Alifah az Zahrah⁴, Muhammad Miftahurrahman⁵, David Prayogi⁶, Komang Dharma Swidana⁷, Rohmatan lil Alamin⁸, Aditya Falen Satriawan⁹, Siti Nur Ajjah¹⁰, Sri Lestari Utami Penulis^{11*}

Fakultas Kedokteran, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

*sri.lestari@uwks.ac.id

Abstrak

Latar belakang: Terdapat berbagai metode isolasi/ekstraksi DNA pada darah total yang bisa digunakan termasuk metode nonorganik dan metode penyerapan (membran silika gel). **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan membandingkan DNA hasil isolasi dari darah total manusia dengan metode norganik dan penyerapan dengan membran silika gel dari Promega kit dan Zymo Research berturut-turut melalui analisis kuantitatif dan kualitatif. **Metode:** Penelitian ini menggunakan 12 sampel darah total manusia yang disimpan dalam vakutainer K3EDTA dan lemari pendingin -80⁰C. Kit yang digunakan untuk isolasi DNA menggunakan metode norganik adalah Wizard® Genomic DNA Purification Kit dari Promega (nomer katalog A1120) sebagai Kit 1. Kit yang digunakan untuk isolasi DNA metode penyerapan membran silika gel adalah *Quick-DNA*TM Miniprep Plus Kit dari Zymo Research (nomer katalog D4069) sebagai kit 2. Analisis kualitatif (konsistensi DNA) menggunakan deskripsi observasi hasil gel elektroforesis 2%. Analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada λ 260 dan 280 nm untuk mengukur konsentrasi DNA dan kemurniannya. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dan tertinggi ditemukan di DNA hasil ekstraksi kit 1 (3 dan 328,6 μ g/l, walaupun demikian nilai rata-rata tingkat kemurniannya lebih rendah daripada kit 2 (1,7 dibandingkan 1,8183). Terdapat perbedaan signifikan rata-rata kemurnian DNA yang dihasilkan dari kit 1 dengan kit 2 (nilai $p = 0,027 < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan dari konsentrasi DNA yang dihasilkan dari kedua kit (nilai $p = 0,301 > 0,05$). Visualisasi DNA dengan elektroforesis gel menunjukkan konsistensi DNA yang dihasilkan adalah utuh dan tidak terfragmentasi. **Kesimpulan:** Pemilihan ekstraksi DNA yang tidak dibatasi oleh biaya, waktu dan tenaga maka metode penyerapan dengan membran silika gel lebih disarankan untuk mendapatkan DNA yang berkualitas dalam jumlah yang cukup untuk analisis berikutnya.

Kata Kunci: Analisis kuantitatif DNA, Analisis kualitatif DNA, Metode nonorganik, Metode penyerapan membran silika gel Fase solid kolom,

PENDAHULUAN

Isolasi DNA yang berkualitas baik merupakan persyaratan untuk penelitian biomolekuler. Ekstraksi DNA dan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan teknik dasar yang digunakan dalam laboratorium molekuler. DNA yang berkualitas

baik dalam jumlah yang cukup dapat digunakan sebagai templat untuk memperbanyak DNA dengan PCR. Ekstraksi DNA merupakan metode untuk memurnikan DNA dengan menggunakan berbagai metode fisik dan/atau kimia dari suatu sampel, yang akan memisahkan DNA dari membran sel dan komponen-komponen seluler lainnya. Friedrich Miescher mengisolasi DNA untuk pertama kalinya di tahun 1869 (Gupta, 2019; Heikrujam dkk, 2020).

Penggunaan teknik isolasi DNA seharusnya mengarah pada ekstraksi yang efisien dengan kuantitas dan kualitas DNA, yang murni dan menghindari kontaminan seperti RNA dan protein-protein. Metode ekstraksi yang manual sama baiknya dengan kit-kit (perlengkapan) ekstraksi DNA yang tersedia secara komersial. Berbagai jaringan dapat digunakan sbagai sampel untuk ekstraksi DNA seperti darah. Ekstraksi DNA melibatkan pelisisan sel dan pelarutan DNA, yang diikuti oleh berbagai metode kimia atau enzimatik untuk menghilangkan berbagai makromolekul, lipid, RNA atau protein. Teknik ekstraksi DNA termasuk ekstraksi secara organik (metode fenol-kloroform), metode nonorganik (penggaraman dan perlakuan proteinase K) dan metode absorpsi (membran silika gel) (Gupta, 2019).

Metode ekstraksi DNA organik menghabiskan lebih banyak waktu dan memerlukan kerja secara intensif. Metode lainnya dari ekstraksi DNA selain teknologi berdasarkan silika (DNA melekat ke bulir-bulir/partikel-partikel silika pada pH spesifik karena keberadaan garam-garam tertentu) adalah pemisahan magnetik (DNA terikat pada manik-,manik secara reversibel, yang diselubungi dengan antibodi terikat DNA), teknologi pertukaran anion, penggaraman, dan gradien kepadatan sesium klorida (Gupta, 2019).

Adanya berbagai metode ini mendasari dilakukannya penelitian yang membandingkan dua metode ekstraksi DNA dari darah. Metode berbeda yang digunakan pada kit yang dipakai adalah dengan metode ekstraksi nonorganik dan absorpsi (membran silika gel pada kolom). Analisis perbandingan keduanya berdasarkan kualitas dan hasil DNA menggunakan spektrofotometer dan gel elektroforesis, yaitu kemurnian, konsentrasi dan konsistensi DNA yang dihasilkan dari ekstraksi DNA.

METODE PENELITIAN

A. Pengambilan Darah

Darah total diambil dari pembuluh vena dan dimasukkan ke venoject dengan K3EDTA (tabung dengan tutup ungu). Venoject ini disimpan di lemari pendingin bersuhu -80°C . Sampel yang akan dianalisis berjumlah 12 tabung dari responden yang berbeda dengan 6 sampel darah untuk masing-masing kit yang dianalisis.

B. Isolasi DNA dengan Metode Nonorganik Menggunakan Kit 1

Kit yang digunakan adalah Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit dari Promega (Amerika Serikat) dengan nomer katalog A1120. Volume darah total yang digunakan adalah 300 µl, yang DNA hasil ekstraksi dilarutkan dalam DNA Rehydration Solution sebanyak 100 µl. Larutan yang digunakan untuk pelisisan sel darah merah dan nukleus adalah Cell Lysis Solution dan Nuclei Lysis Solution. Pengendapan protein-protein yang sudah terlisiskan dilakukan dengan pemberian Protein Precipitation Solution. Proses penggaraman untuk mendapatkan DNA (presipitasi DNA) adalah dengan memberikan isopropanol dan pencuciannya dilakukan dengan etanol 70%. Terdapat pilihan pemberian RNase Solution untuk melisiskan RNA. Sentrifus dilakukan sebanyak 4 kali dengan kecepatan 13.000-16.000 x g pada suhu ruang dengan waktu 20 detik, 1 dan 3 menit. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang dan 65°C.

C. Isolasi DNA dengan Metode Penyerapan Menggunakan Kit 2

Kit yang digunakan adalah *Quick-DNA*[™] Miniprep Plus Kit dari Zymo Research (Amerika Serikat) dengan nomer katalog D4069. Metode penyerapan yang digunakan adalah membran silika gel dalam kolom yang disebut Zymo-Spin[™] IIC-XLR Column. Larutan yang digunakan untuk pelisisan adalah Qiagen Protease dan BioFluid & Cell Buffer (Merah). Volume darah total yang digunakan adalah 200 µl dan diakhiri dengan pemberian Elution Buffer untuk melarutkan DNA sebanyak 50 µl. Larutan yang digunakan untuk mengikat DNA adalah Genomic Binding Buffer. Proses pencucian DNA dengan membersihkan debris-debris molekul kontaminan dilakukan dengan DNA Pre-Wash Buffer (1 kali) dan gDNA Wash Buffer (2 kali). Sentrifus dilakukan sebanyak 6 kali dengan kecepatan ≥ 12.000 x g pada suhu ruang dalam 1 menit. Inkubasi dilakukan pada suhu 55°C selama 10 menit. Beberapa pilihan diberikan untuk meningkatkan hasil isolasi DNA.

D. Kuantitas DNA, Kualitas DNA, dan Analisis Statistik

Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan spektrofometer nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Konsentrasi diukur pada $\lambda = 260$ nm dengan faktor pengali dsDNA adalah 50. Kemurnian DNA diukur dengan membandingkan nilai yang didapat dari hasil pengukuran pada λ 260/280. Nilai ratio ini sekitar 1,8 untuk dsDNA. Jika nilainya kurang dari 1,7 maka menunjukkan adanya kontaminasi protein. Konsistensi DNA dilihat dengan elektroforesis pada gel agarose 2% dan divisualisasi dengan UV illuminator.

Analisis univariat dilakukan dengan data distribusi frekuensi pada nilai minimum, maksimum, rata-rata, dan standar deviasi. Analisis bivariat dilakukan untuk melihat

PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan”

perbedaan rata-rata kedua kit dengan menggunakan uji T pada sampel independen. Program SPP yang digunakan adalah SPSS Statistics 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dan tertinggi ditemukan di DNA hasil ekstraksi kit 1 (Tabel 1). Kemurnian terendah ditemukan di DNA yang diekstraksi dengan Kit 1, yang menunjukkan adanya kontaminan protein. DNA hasil ekstraksi kit 2 mempunyai nilai rata-rata kemurnian 1,8 mempunyai nilai yang lebih baik jika dibandingkan dengan DNA dari kit 1.

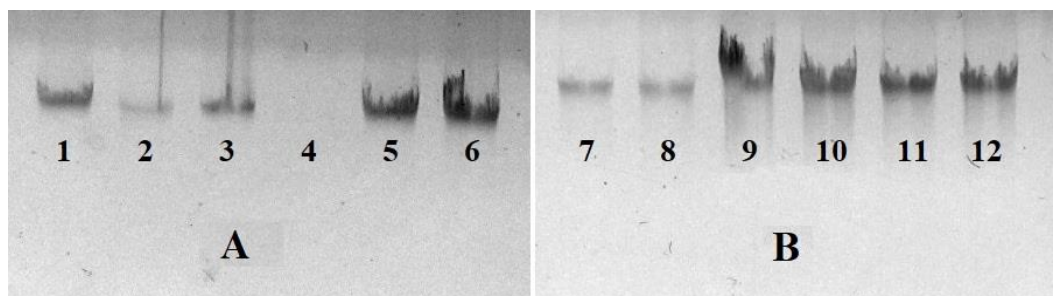
Tabel 1. Distribusi Frekuensi

Variabel	Nilai Minimum	Nilai Maksimum	Nilai Rata-rata	Standar Deviasi
Konsentrasi Kit 1	3	328,6	116,667	116,4416
Kemurnian Kit 1	1,36	1,86	1,7	0,19565
Konsentrasi Kit 2	38,7	218,5	88,783	66,6073
Kemurnian Kit 2	1,73	1,87	1,8183	0,04792

Tabel 2. Analisis data univariat dan bivariat perbandingan penggunaan kit 1 dan kit 2

No	Kemurnian (Ratio λ 260/280)		Nilai p	Konsentrasi (ng/ μ l)		Nilai p
	Kit 1	Kit 2		Kit 1	Kit 2	
1	1,36	1,82	0,027*	328,6	38,7	0,301
2	1,72	1,84		56,4	44,2	
3	1,81	1,81		41,6	218,5	
4	1,86	1,87		3	93,9	
5	1,86	1,84		133,9	65	
6	1,59	1,73		136,5	72,4	

- Nilai p < 0,05



Gambar 1. Visualisasi DNA hasil isolasi dengan kit 1 (A) pada sampel bernomer 1-6 dan kit 2 (B) pada sampel bernomer 7-12 menggunakan gel agarose 2%.

Tabel 2 menunjukkan ada 3 nilai DNA yang diekstraksi dari kit 1 yang kemurniannya $\leq 1,7$, sedangkan hanya 1 nilai dari kit 2. Hasil ini menunjukkan DNA yang terkontaminasi protein pada kit 1 lebih banyak daripada kit 2. Hal ini

PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: *SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan*”

diperkuat dengan adanya perbedaan signifikan rata-rata kemurnian DNA yang dihasilkan dari kit 1 dengan kit 2 (nilai $p = 0,027 < 0,05$). Sedangkan pada konsentrasi DNA yang dihasilkan tidak ada perbedaan rata-rata yang dihasilkan dari kedua kit. Visualisasi DNA dengan elektroforesis gel menunjukkan konsistensi DNA yang dihasilkan adalah utuh dan tidak terfragmentasi (Gambar 1). Tebal dan tipisnya fragmen DNA sesuai dengan konsentrasi DNA yang dikandungnya

Proses isolasi DNA dengan menggunakan kit 1 membutuhkan waktu yang lebih lama daripada kit 2, yaitu 120 menit dibandingkan 60 menit. Tetapi biaya yang dibutuhkan untuk ekstraksi pada kit 2 hingga dua kali lipat jika dibandingkan dengan pada kit 1. Walaupun begitu ada larutan tambahan yang tidak disediakan oleh kit 1 yang harus disediakan sendiri, yaitu isopropanol dan etanol 70%. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Castella dkk. (2006) yang membandingkan efisiensi teknik berbasis silika (QIAamp DNA Mini Kit), Chelex, dan Fenol-Kloroform untuk mengekstraksi DNA dari berbagai kategori sampel, darah dan air liur pada kapas, otot, puntung rokok, air liur pada makanan, dan sel epidermis pada pakaian. Mereka menemukan bahwa efisiensi sistem QIAamp lebih baik daripada teknik Chelex atau Fenol-Kloroform.

Metode ekstraksi DNA dengan fase solid (padat) ini didasarkan pada kemampuan DNA untuk mengikat silika dengan adanya garam chaotropik seperti guanidinium tiosianat, natrium iodida, dan guanidinium hidroklorida. Biasanya, sel-sel terlebih dahulu dilisis dengan proteinase K untuk melepaskan DNA dan kemudian buffer pengikat yang mengandung garam chaotropik ditambahkan untuk menyiapkan DNA agar dapat diserap ke silika pada $pH < 7,5$. Setelah DNA mengikat silika, maka kotoran yang tidak diinginkan dapat dibilas pada langkah pencucian berikutnya. DNA dapat dielusi dalam kondisi basa dan konsentrasi garam rendah. Metode silika dapat dilakukan dalam dua format berbeda: kolom silika dan manik paramagnetik berlapis silika. Dalam kasus pertama, setelah DNA terikat dalam kolom, pencucian kotoran dan elusi DNA dilakukan dengan sentrifugasi. Dalam prosedur manik magnetik, langkah pencucian dan elusi DNA difasilitasi hanya dengan menerapkan gaya magnet tanpa memerlukan perangkat sentrifugasi. Pemurnian berbasis manik magnetik saat ini merupakan salah satu prosedur yang paling sesuai untuk isolasi DNA di bidang forensik karena memungkinkan pemurnian DNA yang cepat dengan menghilangkan inhibitor PCR secara efisien, dan cocok untuk ekstraksi dengan hasil keluaran tinggi menggunakan teknik robotik (Alonso, 2013).

Hasil ini berbeda dengan penelitian untuk melihat perbandingan ekstraksi DNA dalam mengidentifikasi faktor genetik yang terkait dengan perjalanan infeksi SARS-CoV-2. Studi ini membandingkan tiga metode ekstraksi DNA (resin Chelex®100, fenol-kloroform dan kit ekstraksi DNA QIAamp) untuk studi genetik

PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: *SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan*”

inang COVID-19 menggunakan sampel nasofaring dari pasien. Metode ekstraksi yang digunakan pada kit ekstraksi DNA QIAamp adalah membran berbasis silika. Metode pada studi ini membandingkan jumlah langkah yang diperlukan untuk pelaksanaan, waktu penanganan sampel, kualitas dan kuantitas bahan yang diekstraksi dan aplikasi dalam studi genetik. Metode Chelex®100 terbukti paling murah (masing-masing 33 dan 13 kali lebih murah daripada kit komersial dan fenol-kloroform), memberikan hasil DNA tertinggi (masing-masing 306 dan 69 kali lebih tinggi daripada kit komersial dan fenol-kloroform), dengan langkah penanganan paling sedikit sekaligus memberikan kualitas DNA yang memadai untuk aplikasi diujungnya. Secara keseluruhan, hasilnya menunjukkan bahwa resin Chelex®100 adalah metode yang murah, aman, sederhana, cepat, dan cocok untuk ekstraksi DNA sampel nasofaring dari pasien COVID-19 untuk studi genetika. Hal ini khususnya relevan di negara-negara berkembang di mana biaya dan penanganan merupakan langkah-langkah penting dalam pemrosesan material (da Silva dkk, 2023).

Metode ekstraksi DNA fase padat berbasis silika tidak disarankan pada deselularisasi jaringan. Deselularisasi jaringan hewan merupakan cara baru untuk mendapatkan biomaterial yang dapat digunakan dalam rekayasa jaringan dan transplantasi organ. Keberhasilan deselularisasi ini sangat diperlukan karena DNA hewan menyebabkan reaksi inflamasi dan mengandung retrovirus endogen, yang dapat ditularkan ke pasien. Penginderaan imunologis DNA merupakan salah satu kemungkinan reaksi merugikan terhadap xenotransplantasi *in vivo*. Salah satu kriteria untuk keberhasilan deselularisasi adalah fragmentasi dan eliminasi (jumlah residu) DNA dari jaringan. Metode ekstraksi DNA berbasis silika ini sering kali tidak sepenuhnya memurnikan fragmen DNA kecil tertentu. Padahal penentuan jumlah DNA dan distribusi ukuran fragmen yang akurat sangat penting dalam menilai kesesuaian klinis jaringan yang dideselularisasi. Dari fakta yang tersedia saat ini, ekstraksi DNA dari jaringan yang dideselularisasi melalui pendekatan berbasis silika tidak disarankan karena penipisan sfDNA (*short fragmented DNA*), yang menyebabkan perkiraan yang terlalu rendah terhadap kandungan DNA total. Yang lebih cocok adalah metode ekstraksi berbasis pelarut yang memanfaatkan, misalnya, fenol/kloroform, atau metode yang secara selektif mengendapkan protein dan serpihan sel untuk isolasi DNA. Sebagai alternatif, penilaian langsung DNA dalam lisat jaringan dapat dilakukan. Karena tidak ada prosedur ekstraksi yang dilakukan, tidak ada bias dalam deteksi DNA yang diberikan, dan nilai yang diperoleh diharapkan dapat lebih akurat mencerminkan DNA residual dalam sampel (Schmitz dkk, 2021).



PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: *SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan*”

KESIMPULAN

Pemilihan kit yang digunakan untuk ekstraksi DNA tergantung pada biaya, waktu dan tenaga yang tersedia. Apabila ketiganya tidak dibatasi oleh keadaan maka pemilihan ekstraksi DNA yang berbasis metode penyerapan dengan membran silika gel menjadi alternatif pilihan yang lebih efisien untuk hasil DNA yang berkualitas dan dengan jumlah yang cukup.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, A. (2013). *DNA Extraction and Quantification in Encyclopedia of Forensic Sciences*, Second Edition, Academic Press: 214-218.
- Castella, V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C. dan Mangin P. (2006). Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci. Int.* 156: 70-73.
- da Silva, R. C., de Lima, S. C., Reis, W. P. M. S., de Magalhães, J. J. F., de Oliveira-Magalhães, R. N., Rathi, B., Kohl, A., Bezerra, M. A. C., Pena, L. (2023). Comparison of DNA extraction methods for COVID-19 host genetics studies. *Plos One.* 18(10):1-14.
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J lCyto.* 36(2):116-117.
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Behari Mazumder, P. (2020). *The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols*. IntechOpen.
- Schmitz, T. C., Dede-Eren, A., Spierings, J., de Boer, J., Ito, K., Foolen, J. (2021). Solid-phase silica-based extraction leads to underestimation of residual DNA in decellularized tissues. *Xenotransplantation* 28(1): 1-7.