

Optimasi Ekstraksi DNA *Pseudonocardia Carboxydivorans* 18A213O1

Menggunakan Kit Ekstraksi Promega dan Qiagen

Wawan Abdullah Setiawan¹, Syifa Riandani Azzahra², Kusuma Handayani³, Andi Setiawan⁴

^{1,2}Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung, Lampung, Indonesia

e-mail: ¹Wawan.a.setiawan@gmail.com, ²Syfriandani@gmail.com,

³Kusumahandayani@yahoo.co.id, ⁴Andisetiawa@fmipa.unila.ac.id

Abstract

More than 70% of the earth's oceans are known to cover the surface of the earth. High biodiversity makes the ocean a habitat for microorganisms such as tunicates. Tunicates can associate with other microorganisms such as *Pseudonocardia carboxydivorans* so that they can produce bioactive compounds including antibiotics, pesticides and antitumors. The initial stage to identify a bioactive compound is by isolating DNA. This study aims to determine the optimization of bacterial DNA extraction using promega and qiagen extraction kits. This study consists of 3 treatments, namely rejuvenation, bacterial identification and concentration measurement. The results showed that the optimization of using qiagen extraction kit was relatively superior at 1,989 ng/μl - 2,000 ng/μl with 1 hour. While in the optimization of promega extraction, the resulting purity is 1,500 ng/μl - 1,943 ng/μl with a processing time of 2 hours.

Keywords : Tunicate, *Pseudonocardia carboxydivorans*, Promega extraction kit, Qiagen extraction kit.

Abstrak

Luas lautan dipermukaan bumi diketahui mencapai lebih dari 70%. Keanekaragaman hayati yang cukup tinggi menjadikan lautan menjadi habitat bagi para mikroorganisme seperti tunikata. Tunikata dapat bersosiasi dengan mikroorganisme lain seperti *Pseudonocardia carboxydivorans* sehingga mampu menghasilkan senyawa bioaktif diantaranya antibiotik, pestisida serta antitumor. Tahap awal untuk mengidentifikasi suatu senyawa bioaktif adalah dengan cara mengisolasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimasi ekstraksi DNA bakteri menggunakan kit ekstraksi promega

dan qiagen. Penelitian ini terdiri atas 3 perlakuan yaitu permajaan, identifikasi bakteri dan pengukuran konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan optimasi penggunaan kit ekstraksi qiagen relatif lebih unggul yaitu sebesar 1.989 ng/μl – 2.000 ng/μl dengan waktu 1 jam. Sedangkan pada optimasi ekstraksi promega kemurnian yang dihasilkan adalah 1.500 ng/μl – 1.943 ng/μl dengan waktu pengerjaan 2 jam.

Kata Kunci: Tunikata, *Pseudonocardia carboxydivorans*, Kit ekstraksi promega, Kit ekstraksi qiagen.

PENDAHULUAN

Luas lautan yang ada dipermukaan bumi diketahui mencapai lebih dari 70%. Lautan memiliki keanekaragaman hayati yang cukup tinggi dan menjadi habitat bagi mikroorganisme seperti spons, tunikata, fitoplankton dan lainnya (Mark et al., 2017). (Huang et al., 2011) menyatakan 75% senyawa bioaktif berasal dari mikroorganisme invertebrata laut yang diisolasi dari filum Porifera (hewan berpori atau spons) dan Coelenterata.

Tunikata dikenal sebagai salah satu invertebrata laut yang mampu hidup dikedalaman lebih dari 2 meter, tunikata sendiri dapat hidup berkoloni maupun soliter dan hidup sebagai *filter feeder*. Cara hidup seperti ini memungkinkan masuknya mikroorganisme lain seperti bakteri dapat masuk ke dalam tubuh tunikata melalui *branchial siphon* (Diah dkk, 2020). Diketahui bahwa tunikata yang bersosiasi dengan mikroorganisme lain menghasilkan senyawa bioaktif berupa metabolit primer dan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri, antitumor, antikanker serta antiangiogenik (Dhisa et al., 2021). *Actinomycetes* telah diakui

sebagai salah satu sumber penting bagi senyawa bioaktif alami yang menghasilkan lebih dari 10.000 senyawa bioaktif (Shanti dkk., 2016).

Isolasi DNA diperlukan sebagai tahapan awal dalam mengidentifikasi kekerabatan genetik dan mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan dari suatu mikroorganisme. Isolasi DNA sendiri dikenal sebagai suatu proses pemisahan DNA dari komponen sel lainnya (Corkill and Reply, 2008). Dalam mengisolasi DNA diperlukan penggunaan kit ekstraksi yang lebih efisien. Belum diketahuinya keefektifitasan dalam penggunaan perbedaan kit ekstraksi antara promega dan qiagen dalam melakukan ekstraksi DNA khususnya DNA bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans* yang berasal dari tunikata sehingga pada penelitian ini dilakukan optimasi dengan kit ekstraksi promega dan qiagen. Dari hasil yang didapat diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan penggunaan kit ekstraksi yang lebih efisien dan template DNA dapat digunakan untuk pengamatan lebih lanjut. Hingga saat ini, metode ekstraksi DNA yang dikembangkan umumnya diikuti dengan konsekuensi dan biaya yang meningkat. Beberapa hal yang menjadi kendala adalah pada lamanya waktu ekstraksi DNA dikarenakan harus menunggu cukup lama guna mendapatkan sampel yang baik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dan Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung.

Bahan yang digunakan diantaranya agar, glukosa, malt ekstrak, yeast ekstrak, dextrose air laut, koloid kitin, NaOH 10%, NaOH 5%, alkohol 70%, Hcl 1M, Hcl pekat, kulit udang, AP 1, Buffer P3, klorofom, es batu, buffer Aw 1, buffer AW2, buffer AE, blanko (AE), dH₂O, lysozyme, Nucleic Lysis Solution, protein precipitation solution, isopropanol, DNA rehydration solution, bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans*.

Alat yang digunakan antara lain beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, pipet tetes, spinbar, batang pengaduk, tabung reaksi, kaca preparat, corong, cawan petri, kertas saring, gunting, aluminium foil, kapas, mikrotip, plastik wrap, label, tube ujung tumpul, jarum ose bulat, autoclave, laminar air flow, sentrifuse, mikroskop, hot plate, neraca analitik serta nanofotometer.

Bakteri yang telah diremajakan menggunakan media ISP-2 dengan penambahan koloid kitin sebesar 2% kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 minggu. Setelah itu bakteri diremajakan kembali menggunakan media ISP-2 cair selama 3-7 hari guna meminimalisir terbentuknya spora aerial.

Proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan prosedur kerja dari Qiagen dan promega dimana terbagi menjadi beberapa tahapan diantaranya kerusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari komponen lainnya serta pemurnian DNA.

Isolasi dengan kit ekstraksi promega.

Langkah-langkah dalam mengisolasi DNA menggunakan kit ekstraksi promega adalah biakan *Actinomycete* ditambahkan NaOH sebanyak 0,05 gram dan kemudian dipindahkan secukupnya ke tube 1.5 ml ujung tumpul. Kemudian, disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 2 menit dengan suhu 4°C dan supernatan dibuang perlahan. Dilakukan resuspensi sel menggunakan ddH₂O sebanyak 480µl setelah itu ditambahkan lysozyme sebanyak 20µl dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian, disentrifus kembali selama 2 menit dengan kecepatan 16.000 rpm lalu dupernatan dibuang. Dimasukkan 600µl *Nucleic Lysis Solution* dan dihomogenkan menggunakan vortex. Diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 15 menit dan setiap 5 menit dibolak-balik perlahan kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan *Protein precipitation solution* sebanyak 200µl dan dihomogenkan kembali menggunakan vortex lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit. Disentrifus kembali dengan kecepatan 16.000rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang dengan hati-hati pada kertas saring lalu natan ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 600µl dengan cara dibolak-balik berfungsi untuk mencuci pellet DNA. Setelah itu, disentrifus kembali selama 2 menit dengan kecepatan 16.000rpm dan kemudian tabung ditiriskan diatas kertas

penyerap bersih serta natan dibiarkan mengering pada suhu ruang selama 10-15 menit. Selanjutnya, ditambahkan DNA *Rehydration Solution* sebanyak 30 μ l ke dalam tabung lalu DNA direhidrasi dengan cara diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C (Promega, 2019).

Isolasi dengan kit ekstraksi qiagen

Adapun prosedur kerja isolasi DNA menggunakan kit qiagen merujuk pada prosedur kerja Qiagen (2023) yaitu biakan bakteri dipindahkan ke tube tumpul 2-3 ml dan disentrifus dengan kecepatan 13.500rpm selama 5 menit 4°C. Ditambahkan \pm 400 μ l AP 1 dan kemudian *tissue lyser* selama 2 menit. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit dan setiap 5 menit dibolak-balik. Ditambahkan 150 μ l buffer P3 dan 150 μ l klorofom dengan metode inversi lalu dipindahkan ke tube lancip dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu dingin. Inokulum disentrifus kembali dengan kecepatan 13.500rpm selama 2 menit pada suhu 4°C hingga terbentuk 3 lapisan dan diambil lapisan teratas. Setelah itu lapisan teratas dipindahkan ke tube Dneasy ungu sebanyak \pm 500 μ l dan disentrifus kembali dengan kecepatan 13.000rpm selama 2 menit. Superatan dipindahkan ke tube lancip baru pada kondisi dingin secara hati-hati supaya tidak menyentuh natan. Kemudian, ditambahkan buffer AW1 sebanyak 1,5ml dan dihomogenkan menggunakan teknik inversi. Sebanyak 500 μ l larutan dipipet dan dimasukkan ke dalam tube Dneasy Column putih dan disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 8000rpm dan supernatan dibuang. Setelah itu, filter dipindahkan ke *collection tube* yang baru dan ditambahkan buffer AW2 sebanyak 500 μ l lalu disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 8000rpm dan cairan pada tube bawah dibuang. Filter *Dneasy column* dipindahkan ke tube lancip yang baru kemudian ditambahkan buffer AE 35 μ l dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya disentrifus selama 3 menit pada suhu 4°C dengan

kecepatan 8000rpm. Langkah selanjutnya ditambahkan blanko (AE) yang diambil sebanyak 1,5 μ l dimasukkan ke dalam kuvet untuk tahap selanjutnya menggunakan *implen nanophotometer*.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

Konsentrasi dan kemurnian DNA dari isolat bakteri *Pseudocardia carboxydivorans* yang telah diisolasi menggunakan 2 kit ekstraksi yang berbeda yaitu promega dan qiagen kemudian diukur menggunakan alat yang bernama nanofotometer dengan rasio absorbansi (A260/A280). Pengukuran konsentrasi dan kemurnian merupakan hal yang penting dalam tahap isolasi DNA. Buffer lisis yang digunakan pada isolasi DNA diteteskan pada sensor nanofotometer sebanyak 1 μ l yang akan dijadikan sebagai blanko. Lalu sensor dibersihkan dan diteteskan isolat bakteri *Pseudocardia carboxydivorans* sebanyak 1 μ l dan kemudian dilakukan *running* pada nanofotometer. Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan nanofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260nm untuk mengukur konsentrasi asam nukleat, sedangkan untuk mengukur protein menggunakan panjang gelombang 280nm. Untuk menghitung konsentrasi DNA merujuk pada rumus perhitungan sambrook (1989) konsentrasi DNA (μ l/ml)= A260 x 50 (Qiagen, 2023) μ l x faktor pengenceran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang relatif lebih besar ditunjukkan pada ekstraksi DNA *Pseudocardia carboxydivorans* menggunakan kit ekstraksi qiagen yang menunjukkan nilai kemurnian sebesar 1.989ng/ μ l - 2.000ng/ μ l. Sedangkan pada penggunaan kit ekstraksi promega menunjukkan nilai kemurnian relatif lebih kecil sebesar 1.943ng/ μ l – 1.500ng/ μ l. Untuk kemurnian DNA dilihat dari nilai rasio absorbansi A260/A280. Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil perbedaan konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan

Kode isolat	Kit Ekstraksi	Pengulangan	Panjang Gelombang		Konsentrasi ($\mu\text{l/ml}$)	Kemurnian (A260/A280)
			A260	A280		
18A213-O1	Qiagen	1	0.195	0.101	95.8 ng/ μl	1.989 ng/ μl
		2	0.344	0.175	170 ng/ μl	2.000 ng/ μl
	Promega	1	0.070	0.037	33.9 ng/ μl	1.943 ng/ μl
		2	0.006	0.004	-	1.500 ng/ μl

Dapat dilihat pada tabel 1. bahwa isolat DNA bakteri yang diekstraksi menggunakan kit ekstraksi qiagen relatif lebih tinggi kemurniannya dibandingkan penggunaan kit ekstraksi promega. Waktu yang dibutuhkan dalam mengisolasi DNA menggunakan kit ekstraksi qiagen relatif lebih singkat yaitu 1 jam dibandingkan waktu yang dibutuhkan untuk mengisolasi DNA menggunakan kit ekstraksi promega yaitu berkisar 2 jam.

Bellard (1973) menyatakan bahwa tingkat kemurnian yang relatif lebih rendah dapat disebabkan karena masih tingginya komponen pengotor DNA seperti protein yang tidak terdegradasi sempurna. Hal ini dapat disebabkan karena protein dapat berasal dari komponen sel yang tidak lisis selama proses isolasi atau berasal dari fenol sebagai bahan

yang berfungsi untuk mempresipitasi DNA.

Faktor yang mempengaruhi hasil konsentrasi dari ekstraksi DNA diantaranya komposisi penambahan lisis buffer serta kecepatan waktu ekstraksi dikarenakan pada tahap lisis sel serta presipitasi apabila pengambilan supernatan tidak dilakukan persampel maka akan terjadi pengendapan DNA (Emilia dkk, 2021). Jika nilai kemurnian DNA yang didapatkan kurang dari 1,8 ng/ μl maka diketahui telah terjadinya kontaminasi hasil ekstraksi berupa fenol, protein maupun karbohidrat sedangkan apabila nilai kemurnian DNA yang didapatkan lebih dari 2,00ng/ μl hasil ekstraksi DNA telah terkontaminasi oleh buffer yang terbawa saat ekstraksi (Hasrida dkk, 2016).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan yang didapat dari hasil penelitian adalah konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan oleh kit ekstraksi qiagen relatif lebih besar berkisar 1.989ng/ μl -2.000ng/ μl sedangkan kit ekstraksi promega menghasilkan 1.500 ng/ μl - 1.943 ng/ μl serta penggunaan kit ekstraksi qiagen menghasilkan DNA yang relatif lebih murni dan waktu pengerjaan relatif lebih singkat yaitu 1 jam disbanding penggunaan kit ekstraksi promega yang membutuhkan waktu berkisar 2 jam.

Untuk meyakinkan keefektivitasan dan efisiensi penggunaan perbedaan kit ekstraksi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan bakteri lain.

DAFTAR PUSTAKA

Bellard, M. G., Pierre, O., & Pierre, C. (1973). Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mamalian Cells. *European Journal of Biochemistry*,

36(1): 32-38.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02881.x>.

Diah, A., Rhesi, K., & Mezan, A. (2020). Potensi Bakteri Asosiasi Tunikata Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Guna Menghambat Pertumbuhan Bakteri Multidrug Resistent. *Pasir Laut*, 4(2): 102-107. <https://doi.org/10.14710/jpl.2020.32807>.

Disha, V., Jiun, Y. W., Khatijah, Y., Rabiha, S., Swee, H., Kok, S., & Chou, M. (2021). Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine drugs*, 19(5): 246. <https://doi.org/10.3390/md19050246>.

Emilia, Essy, H., & Ashabul, A. (2021). Optimasi Metode Ekstraksi DNA Daun, Kulit Kayu dan Kayu Pinus Merkussi Jungh. Et De Vriese.

- Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, 6(4): 766-778.
<https://jim.usk.ac.id/JFP/article/view/18233>.
- Hasrida, M. I., & Yusran, U. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirotris*. *Vektor Penyakit*, 10(1). 7-9. DOI:10.22435/vektor.v10i1.6251.7-10.
- Huang, G. P., Jie, Y., Li, S., Zhi, G. S., Jue, H. W., Xiu, J. L., . . . Sheng, P. C. (2011). Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained Between 1985 and 2008. *Marine Drug*, 9(4): 514-525. <https://doi.org/10.3390%2Fmd9040514>.
- Mark, J., & Chhaya, C. (2017). Marine Biodiversity, Biogeography, Deep-Sea Gradients and Conservation. *Current Biology*, 27(11): 511-527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.060>.
- Promega. (2023, October Wednesday). *Wizard Genomic DNA Purification Kit*. Retrieved from www.promega.com: <https://www.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/>
- Qiagen. (2023, October Wednesday). *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*. Retrieved from www.qiagen.com: <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
- Sambrook, J. E., Fritsch, F. J., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Spring Harbor: Cold Spring Harbor.
- Shanti, R., Pamella, A., Fahrurozi, Puspita, L., & Wien, K. (2016). Aktivitas Antibakteri Aktinomisetes Laut Dari Pulau Enggano. *Ilmu-Ilmu Hayati*, 15(3): 275-283. <http://dx.doi.org/10.14203/beritabiologi.v15i3.2258>.