

# Teknik Dasar Biologi Molekuler

Jilid 1

Dindin Hidayatul Mursyidin





---

# TEKNIK DASAR BIOLOGI MOLEKULER (Jilid 1)

DINDIN HIDAYATUL MURSYIDIN



---

**Teknik Dasar Biologi Molekuler  
(Jilid 1)**

Dindin Hidayatul Mursyidin

i-xiii + 131 halaman, 15.5 x 23.0 cm

ISBN:

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang  
*All Rights Reserved*

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin  
tertulis dari Penerbit, kecuali untuk kutipan singkat  
demi penelitian ilmiah dan resensi

Cetakan Pertama: Januari 2024

**PENERBIT:**

ULM Press, 2024

d/a Pusat Pengelolaan Jurnal dan Penerbitan ULM

Lantai 2 Gedung Perpustakaan Pusat ULM

Jl. Hasan Basri, Kayutangi, Banjarmasin 70123

Telp/Fax. 0511 - 3305195

ANGGOTA APPTI (004.035.1.03.2018)

---

# Kata Pengantar

*Alhamdulillah* rabbil 'alamin, segala puji dan syukur hanya bagi Allah *subhanahu wa ta'ala*, karena atas pertolongan dan karunia-Nya, maka penulis dapat menyelesaikan buku ajar "Teknik Dasar Biologi Molekuler.

Buku ini adalah jilid pertama dari dua jilid yang rencananya akan diterbitkan pada kesempatan mendatang, berisi tentang konsep dasar teknik biologi molekuler.

Semenjak pandemi Covid-19 berkembang, "PCR" (*Polymerase chain reaction*) yang merupakan salah satu istilah atau teknik dalam biologi molekuler lazim dan sering di dengar di tengah masyarakat Indonesia. Sejatinya, PCR merupakan teknik biologi molekuler yang memiliki peran penting dalam banyak bidang, tidak hanya untuk mendeteksi keberadaan virus covid, tetapi juga hal-hal lainnya, seperti identifikasi keragaman genetik suatu plasma nutfah, identifikasi kelainan genetik dan forensik (biomedis), serta identifikasi kultivar dan penelusuran gen-gen terpaut sifat unggul (bidang pertanian).

Dalam bidang biologi molekuler, terdapat pula beberapa teknik lain yang penting untuk dipelajari, namun mungkin belum diketahui oleh masyarakat secara lebih luas. Oleh karena itu, hadirnya buku ini diharapkan menambah khasanah ilmiah bagi pihak-pihak tertentu yang memerlukan serta masyarakat secara umum.

Tentunya, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang tidak terhingga, terutama kepada Universitas Lambung Mangkurat (ULM) atas dukungannya dalam penyusunan dan penerbitan buku ini. Penulis juga ingin mengucapkan terimakasih kepada teknisi dan mahasiswa yang bekerja di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler FMIPA ULM, serta seluruh teman-teman mahasiswa

---

yang tergabung dalam Kelompok Studi Ilmiah “Genetika dan Biologi Molekuler” Program Studi Biologi FMIPA ULM, termasuk berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, dan telah membantu, baik moril maupun materiil, langsung maupun tidak langsung, atas terwujudnya buku ajar ini.

Tentunya dalam penyusunan buku ini masih jauh dari sempurna (banyak kekurangan). Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk penyempurnaan buku ini pada masa mendatang.

Banjarbaru, Januari 2024

**Penulis**

---

# Prakata

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, terutama bidang biologi molekuler dan bioteknologi, serta minimnya literatur tentang hal tersebut (terkhusus yang berbahasa Indonesia) menjadi pendorong utama bagi penulis untuk menyusun buku ini.

Secara khusus, buku ajar ini diperuntukkan bagi para mahasiswa strata-1 yang mengambil matakuliah Biologi Molekuler, Teknik Biologi Molekuler, Biologi Sel dan Molekuler, atau matakuliah yang berkaitan, seperti Biokimia, Teknik Biokimia dan Bioteknologi.

Namun, buku ini juga diharapkan dapat bermanfaat bagi banyak pihak, baik pelajar, akademisi, maupun peneliti di lembaga pemerintah atau non-pemerintah (swasta), serta masyarakat secara umum.

Alhasil, semoga buku ini bermanfaat untuk semuanya dan selamat membaca!!

Banjarbaru, Januari 2024

**Penulis**

---

# Sinopsis

Secara ringkas, buku ajar “Teknik Dasar Biologi Molekuler” ini terdiri atas lima bab. Bab pertama, membahas mengenai isolasi dan purifikasi DNA. Sebagaimana diketahui, seiring permintaan berbagai analisis molekuler yang terus meningkat, seperti sidik-jari (*fingerprint*) DNA, pengembangan perpustakaan genom (*genomic library*), serta PCR (*polymerase chain reaction*) secara umum, maka isolasi DNA merupakan kegiatan penting yang harus dilakukan. Oleh karena itu, dalam bab ini dibahas secara terperinci, tentang tahapan isolasi DNA, komponen atau bahan yang digunakan dalam analisis tersebut, faktor-faktor yang mempengaruhinya, serta solusi untuk menangani permasalahan yang terjadi dalam isolasi DNA.

Pada bab kedua, dibahas tentang isolasi dan purifikasi RNA. Sebagaimana DNA, senyawa RNA pun sangat penting dalam analisis molekuler, terutama untuk mempelajari pola dan mekanisme ekspresi gen. Disamping itu, mengingat isolasi RNA murni dan utuh adalah langkah penting dalam analisis berikutnya, seperti Northern, pemetaan RNA, RT-PCR, konstruksi perpustakaan eDNA, dan analisis translasi secara *in vitro*. Oleh karena itu, pada bab ini pun dibahas secara terperinci mengenai tahapan isolasi RNA, komponen atau bahan yang digunakan, faktor-faktor yang mempengaruhinya, serta solusi untuk menangani permasalahan yang terjadi dalam isolasi RNA.

Pada bab ketiga, dibahas tentang dua metode untuk menetapkan konsentrasi asam nukleat (DNA/RNA), yaitu kuantifikasi spektrofotometri UV dan pewarna fluoresensi. Dalam biologi molekuler, kuantifikasi asam nukleat (DNA/RNA) umumnya dilakukan untuk menentukan konsentrasi rata-rata DNA atau RNA yang terdapat dalam campuran/larutan, serta kemurniannya. Beberapa analisis molekuler



---

seringkali memerlukan jumlah dan kemurnian asam nukleat tertentu untuk menghasilkan kinerja optimal.

Bab keempat membahas tentang amplifikasi DNA menggunakan metode PCR. Secara prinsip, analisis PCR relatif sederhana dan melibatkan amplifikasi enzimatik dari fragmen DNA yang diapit oleh dua oligonukleotida (primer) yang dihibridisasi pada untai cetakan DNA yang berlawanan, terutama ujung 3' saling berhadapan. Dalam menunjang keberhasilan reaksi ini, maka memahami konsep dasar, komponen dan faktor yang mempengaruhi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR sangat diperlukan. Dalam bab ini dibahas pula mengenai solusi untuk menangani permasalahan dalam amplifikasi DNA.

Pada bab terakhir (kelima), membahas tentang konsep elektroforesis gel agarosa dan semua faktor penting yang mempengaruhi pemisahan pita DNA secara optimal dalam gel tersebut. Protokol tambahan untuk menjalankan gel agarosa standar dan resolusi tinggi juga dibahas dalam bab ini, termasuk metode isolasi fragmen DNA dari gel elektroforesis. tentang elektroforesis gel agarosa.

---

# Daftar Isi

Halaman Sampul | i

Halaman Judul | ii

Kata Pengantar | iii

Prakata | v

Sinopsis | vii

Daftar Isi | ix

Daftar Tabel | xiii

Daftar Gambar | xv

## 1 Isolasi dan Purifikasi DNA | 1

1.1 Capaian Pembelajaran | 1

1.2 Pendahuluan | 1

1.3 Isolasi DNA | 3

1.4 Larutan Isolasi DNA | 3

1.4.1 Mengatur pH, konsentrasi dan kekuatan ionik  
larutan bufer | 4

1.4.2 Inhibitor DNase dan detergen | 7

1.5 Tahap Isolasi DNA | 12

1.5.1 Pemecahan sel (lisis) | 12

1.5.2 Penghilangan protein | 14

1.5.3 Penghilangan RNA | 26

1.5.4 Presipitasi DNA | 28

1.5.5 Pemurnian DNA satu langkah (*single-step*) | 37

1.5.6 Pemurnian DNA plasmid | 37

1.5.7 Penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA | 40

1.5.8 Penyimpanan DNA | 40

1.6 Latihan Soal | 42

---

<b>2</b>	<b>Isolasi dan Purifikasi RNA</b>	<b>  45</b>
2.1	Capaian Pembelajaran	45
2.2	Pendahuluan	45
2.3	Isolasi dan Purifikasi RNA Total	47
2.4	Penghilangan RNase	49
2.5	Metode Isolasi RNA Total	51
2.5.1	Metode guanidium fenol-panas	51
2.5.2	Metode garam litium klorida kadar tinggi	53
2.5.3	Sentrifugasi gradien densitas	53
2.5.4	Metode komersial 'TRI-reagent'	54
2.6	Isolasi mRNA atau Poly (A) <sup>+</sup>	55
2.7	Metode Isolasi mRNA	59
2.8	Latihan Soal	62
<b>3</b>	<b>Kuantifikasi DNA/RNA</b>	<b>  65</b>
3.1	Capaian Pembelajaran	65
3.2	Pendahuluan	65
3.3	Analisis Spektrofotometri	66
3.3.1	Kemurnian sampel	67
3.3.2	Kontaminan lain	70
3.4	Kuantifikasi Menggunakan Pewarna Fluoresen	71
3.5	Jenis pewarna fluoresen	71
3.6	Latihan Soal	80
<b>4</b>	<b>Amplifikasi DNA (PCR)</b>	<b>  81</b>
4.1	Capaian Pembelajaran	81
4.2	Pendahuluan	81
4.3	Kinetika Reaksi Amplifikasi (PCR)	83
4.4	Komponen Standar Reaksi PCR	86
4.4.1	DNA polimerase	86
4.4.2	Cetakan (template) DNA	88
4.4.3	Primer	88
4.4.4	Substrat	89

---

4.4.5	Konsentrasi $MgCl_2$	90
4.4.6	Bufer dan garam	91
4.4.7	Profil suhu panas	92
4.5	Peralatan PCR (Pemakaian Alat)	94
4.6	Visualisasi Hasil PCR	95
4.7	Latihan Soal	98
<b>5</b>	<b>Elektroforesis Gel Agarosa</b>	<b>  99</b>
5.1	Capaian Pembelajaran	99
5.2	Pendahuluan	99
5.3	Prinsip Dasar Elektroforesis	99
5.4	Elektroforesis Gel Agarosa	101
5.4.1	Mobilitas fragmen DNA	102
5.4.2	Konformasi DNA	103
5.4.3	Bufer elektroforesis	105
5.4.4	Ukuran gel	108
5.4.5	Konsentrasi sampel	109
5.4.6	<i>Loading dye</i>	110
5.4.7	Pewarna gel	112
5.4.8	Mendokumentasikan gel elektroforesis	113
5.5	Elusi Fragmen DNA dari Gel Agarosa	114
5.5.1	Elektroelusi	115
5.5.2	<i>Low-melting-point agarose</i>	115
5.5.3	Enzim pendigesti agarosa	116
5.5.4	Serbuk ( <i>powder</i> ) silika	117
5.6	Pewarnaan Gel untuk Re-isolasi DNA	117
5.7	Latihan Soal	119
	<b>Daftar Pustaka</b>	<b>  121</b>
	<b>Glosarium</b>	<b>  123</b>
	<b>Indeks</b>	<b>  129</b>
	<b>Profil Penulis</b>	<b>  131</b>

---

# Daftar Tabel

- Tabel 1.1** Komposisi sel prokariotik dan eukariotik, diwakili *E. coli* dan sel manusia (HeLa) | 2
- Tabel 1.2** Jenis dan kadar garam yang digunakan dalam presipitasi DNA | 31
- Tabel 2.1** Perbandingan komposisi DNA dan RNA | 48
- Tabel 2.2** Karakteristik rentang densitas DNA, RNA dan protein | 54
- Tabel 2.3** Tipe RNA dan fungsinya | 56
- Tabel 3.1.** Koefisien kehilangan DNA untai ganda dan protein | 68
- Tabel 4.1** Hubungan antara jumlah awal molekul target ( $N_0$ ) dan rekomendasi jumlah siklus dalam reaksi PCR | 85
- Tabel 4.2** Rekomendasi jumlah cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi standar PCR | 85
- Tabel 4.3** DNA polimerase termostabil yang tersedia secara komersial dan karakteristiknya | 87
- Tabel 5.1** Saran penggunaan konsentrasi agarosa dan kekuatan medan listrik untuk pemisahan optimal fragmen DNA | 105
- Tabel 5.2** Migrasi fragmen DNA relatif terhadap bromofenol biru | 106
- Tabel 5.3** Migrasi fragmen DNA menggunakan pewarna xilena cyanol | 111

---

# Daftar Gambar

- Gambar 1.1** Ilustrasi skematik sel yang didalamnya materi genetik DNA ditemukan, dalam nukleus, mitokondria dan kloroplas | 2
- Gambar 1.2** Tris bufer yang dititrasi menggunakan HCl dan berada pada kisaran pH 8 akan mengandung ikatan basa dan asam lemah konjugatnya | 5
- Gambar 1.3** Persenyawaan Tris dan NaCl | 6
- Gambar 1.4** Aktivitas EDTA sebagai pengkhelat ion  $Mg^{++}$  | 8
- Gambar 1.5** Struktur SDS dan LDS | 9
- Gambar 1.6** Struktur sarkosil | 10
- Gambar 1.7** Struktur Sodium 4-aminocalicylate (A) dan sodium tri-isopropyl naphthalene sulfonate | 11
- Gambar 1.8** Struktur molekul CTAB dan karakter skematiknya | 11
- Gambar 1.9** Persenyawaan xantat dengan polisakarida (selulosa) | 20
- Gambar 1.10** Struktur molekul Proteinase K | 24
- Gambar 1.11** Struktur molekul Pronase | 24
- Gambar 1.12** Pematangan RNA oleh RNase A | 27
- Gambar 1.13** Reaksi RNase T1 pada tahap transfosforilasi dan hidrolisis | 28
- Gambar 1.14** Ilustrasi DNA yang dikelilingi molekul air | 29
- Gambar 1.15** Netralisasi DNA oleh ion  $Na^+$  | 33
- Gambar 1.16** Kompleksitas larutan DNA setelah penambahan natrium asetat dan alkohol | 33
- Gambar 1.17** Contoh skematik dialisis DNA menggunakan filter komersial | 36
- Gambar 1.18** Ilustrasi skematik DNA plasmid dan kromosom dalam sel bakteri | 37
- Gambar 1.19** Ilustrasi skematik lisis basa dalam preparasi DNA plasmid | 39

- 
- Gambar 1.20** Ilustrasi skematik preparasi DNA plasmid menggunakan metode perebusan | 39
- Gambar 2.1** Struktur molekul RNA | 46
- Gambar 2.2** Contoh preparasi RNA total menggunakan metode guanidinium-fenol panas | 51
- Gambar 2.3** Struktur skematik mRNA | 55
- Gambar 2.4** Kolom kromatografi afinitas Oligo-dT yang digunakan untuk isolasi Poli (A) + fraksi dari RNA total | 59
- Gambar 2.5** Contoh preparasi Poli (A) menggunakan oligo(dT)-selulosa yang dikemas dalam kolom spin | 60
- Gambar 2.6** Ilustrasi aplikasi oligo(dT) yang terikat pada permukaan partikel magnetik untuk isolasi mRNA | 61
- Gambar 3.1** Diagram skematik analisis asam nukleat menggunakan spektrofotometer UV | 66
- Gambar 3.2** Struktur etidium bromida | 72
- Gambar 3.3** Struktur propidium iodida | 73
- Gambar 3.4** Struktur kristal violet | 74
- Gambar 3.5** Struktur dUTP terkonjugasi | 75
- Gambar 3.6** Struktur DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) | 75
- Gambar 3.7** Struktur 7-AAD (7-aminoactinomycin D) | 77
- Gambar 3.8** Struktur Hoechst 33258 | 78
- Gambar 3.9** Struktur YOYO-1 | 79
- Gambar 4.1.** Diagram skematik amplifikasi DNA yang dihasilkan dari reaksi berantai DNA polimerase | 82
- Gambar 5.1** Struktur molekul agarosa | 101
- Gambar 5.2** Struktur molekul TAE | 106
- Gambar 5.3** Struktur molekul TBE | 107
- Gambar 5.4** Contoh kompleks tetra boro hibrida | 108
- Gambar 5.5** Interkalasi EtBr ke dalam molekul DNA | 112





---

# 1

## Isolasi dan Purifikasi DNA

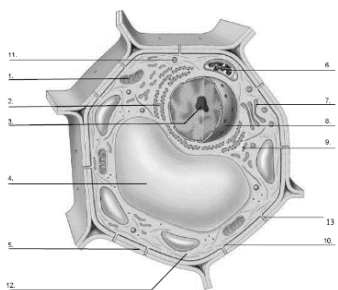
### 1.1 Capaian Pembelajaran

- 1 Mahasiswa mengetahui dan memahami komponen-komponen untuk isolasi DNA
- 2 Mahasiswa mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi isolasi DNA
- 3 Mahasiswa mampu mengetahui dan memahami solusi untuk menangani permasalahan dalam isolasi DNA

### 1.2 Pendahuluan

Isolasi DNA merupakan prosedur penting yang harus dilakukan, karena dapat mempengaruhi hasil analisis berikutnya secara langsung.

Seiring permintaan berbagai analisis molekuler yang terus meningkat, seperti sidik-jari (*fingerprint*) DNA, pembacaan urutan (*sequencing*) DNA, dan pengembangan perpustakaan genom (*genomic library*), serta PCR secara umum, termasuk studi mengenai struktur genom dan ekspresi gen, maka isolasi DNA merupakan kegiatan penting yang harus dilakukan untuk menunjang keberhasilan berbagai analisis tersebut. Dengan kata lain, mendapatkan DNA yang memiliki kuantitas, kualitas, dan integritas tinggi menjadi salah satu fokus utama dalam kajian biologi molekuler.



**Gambar 1.1** Ilustrasi skematik sel yang didalamnya materi genetik DNA ditemukan, dalam nukleus, mitokondria dan kloroplas.

Secara konsep, DNA merupakan bagian kecil dari sel yang secara umum terlokalisasi pada bagian tertentu di dalam struktur tersebut, atau disebut 'organel' (Gambar 1.1). Pada sel prokaryotik, DNA ditemukan dalam nukleoid, yaitu suatu struktur yang tidak diselubungi oleh suatu cairan atau membran tertentu. Sementara itu, pada sel eukaryotik, sebagian besar DNA ditemukan di dalam nukleus, yang dipisahkan dari sitoplasma oleh suatu membran tertentu. Nukleus sendiri mampu menyumbang sekitar 90% dari total DNA seluler.

Sementara sisanya, terdapat pada organel lain, seperti mitokondria dan kloroplas. Pada virus dan bakteriofag, DNA dibungkus oleh suatu lapisan (*coat*) protein dan menyumbang sekitar 30 hingga 50 persen dari total massa virion. Namun pada sel prokaryotik dan eukaryotik, DNA hanya mampu menyumbang sekitar 1% dari total massa sel tersebut. Contohnya dapat dilihat pada Tabel 1.1.

**Tabel 1.1** Komposisi sel prokaryotik dan eukaryotik, diwakili *E. coli* dan sel manusia (*HeLa*).

Komponen sel	Berat total sel (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>HeLa</i>
Air	70,0	70,0
Asam amino	0,4	0,4
Nukleotida	0,4	0,4
Lipid	2,2	2,8
Protein	15,0	22,3
RNA	6,0	1,7
DNA	1,0	0,85

---

### 1.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan materi tersebut dari komponen-komponen sel lainnya (kontaminan), terutama RNA dan protein.

Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan materi tersebut dari seluruh komponen yang terdapat di dalam sel, sehingga menghasilkan sampel DNA yang homogen (murni) dan mewakili seluruh informasi genetik yang

dimilikinya. Pemisahan DNA dari komponen sel lainnya relatif mudah dilakukan, karena molekul tersebut memiliki bobot dan ukuran relatif besar. Oleh karena itu, komponen utama sel yang harus dihilangkan selama pemurnian DNA adalah protein dan RNA. Kotak 1.1 menyajikan persyaratan umum isolasi DNA.

Disamping itu, dua hambatan utama lainnya untuk mendapatkan DNA yang memiliki kualitas dan berat molekul tinggi adalah pemotongan hidrodinamik dan degradasinya oleh DNA non-spesifik. Untuk menghindari hal tersebut, maka beberapa tindakan pencegahan harus dilakukan (Kotak 1.2).

### 1.4 Larutan Isolasi DNA

Bahan isolasi DNA harus dilarutkan dalam larutan penyangga, selanjutnya disebut 'bufer lisis'.

Bahan yang digunakan untuk isolasi DNA harus dilarutkan dalam larutan penyangga atau *bufer* lisis. Bufer lisis sendiri harus memenuhi beberapa kriteria berikut:

- mampu mempertahankan struktur DNA selama tahap pemecahan dan pemurnian.
- memudahkan isolasi DNA, yaitu untuk memudahkan pemisahan protein dan RNA.
- mampu menghambat enzim pendegradasi DNA yang terdapat di dalam sel.
- mampu mencegah modifikasi kimia molekul DNA oleh komponen cairan sel yang keluar saat perusakan sel.

---

**Catatan:** Konsentrasi bufer yang tepat, pH, kekuatan ionik dan penambahan inhibitor DNase dan deterjen harus memenuhi semua persyaratan ini.

### **Kotak 1.1** Persyaratan umum isolasi DNA

Berikut ini adalah beberapa persyaratan umum isolasi DNA yang efektif untuk dilakukan:

- Isolasi harus menghasilkan DNA tanpa senyawa pengotor atau kontaminan, terutama protein dan RNA.
- Isolasi harus efisien, karena sebagian besar DNA seluler harus diisolasi dan dimurnikan terlebih dahulu. Isolasi juga harus bersifat nonselektif, maksudnya semua sampel DNA di dalam sel harus dimurnikan dengan efisiensi yang sama.
- Isolasi tidak boleh mengubah molekul DNA, baik secara fisik maupun kimiawi.
- DNA yang diperoleh harus memiliki bobot molekul tinggi dan sejumlah kecil pemutusan untai tunggal.
- Isolasi DNA harus dilakukan secara cepat dan sederhana sehingga tidak memerlukan waktu yang lama dalam pengerjaannya. Hal ini penting karena preparasi DNA hanyalah tahap awal dari serangkaian penelitian berikutnya yang akan dilakukan.

#### **1.4.1 Mengatur pH, konsentrasi dan kekuatan ionik larutan penyangga (bufer)**

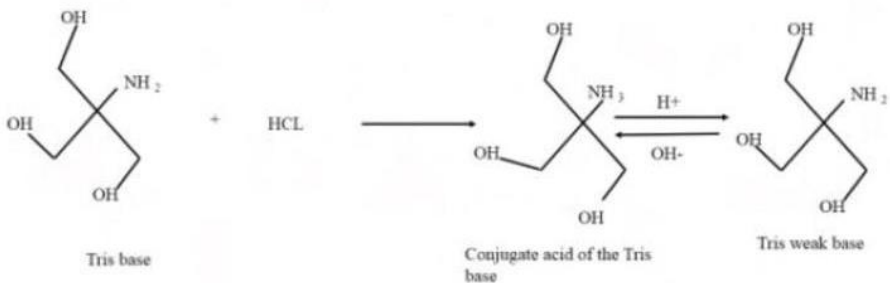
Buf er lisis yang lazim digunakan dalam isolasi DNA adalah Tris, karena murah dan memiliki kapasitas penyangga yang sangat baik.

Tris adalah larutan bufer yang paling umum digunakan dalam isolasi DNA. Secara kimiawi, Tris adalah senyawa aminometana atau hidrosimetil ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>), yang memiliki tiga alkohol primer dan kelompok amina, serta aktivitas penyangga yang efektif antara pH 7 dan 9. Ketika diatur pada

pH 8 menggunakan HCl, larutan tersebut akan mengandung campuran basa dan asam lemah konjugatnya (Gambar 1.2).

**Kotak 1.2 Tindakan pencegahan untuk menghindari pemotongan DNA**

- Semua larutan harus mengandung senyawa penghambat (inhibitor) DNase.
- Seluruh peralatan gelas, ujung pipet plastik, tabung centrifuge, dan larutan penyangga yang akan digunakan harus disterilkan terlebih dahulu.
- Saat penghancuran sel harus menghindari gaya kuat yang dapat menyebabkan pemutusan ikatan DNA.
- Dalam larutan, DNA harus selalu dipipet secara perlahan menggunakan pipet dengan ujung lebar (diameter lubang sekitar 3-4 mm). Ujung pipet juga harus selalu terendam dalam cairan saat memipet DNA.
- Larutan DNA tidak boleh dibiarkan mengalir pada sisi tabung, juga tidak boleh dikocok secara kuat atau divortex.
- Sangat dianjurkan untuk menggunakan reagen kimia yang memiliki kualitas *ultra-pure* atau *molecular biology grade*.

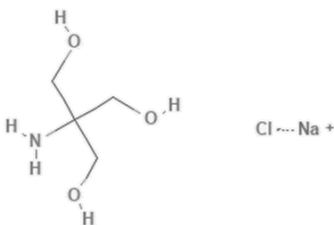


**Gambar 1.2** Tris bufer yang dititrasi menggunakan HCl dan berada pada kisaran pH 8 akan mengandung ikatan basa dan asam lemah konjugatnya.

Dalam isolasi DNA, Tris lazim digunakan karena murah dan memiliki kapasitas penyangga yang sangat baik. Konsentrasi dan pH bufer yang digunakan harus cukup untuk mempertahankan  $\text{pH} > 9$  dan  $< 12$  setelah perusakan sel.  $\text{pH}$  larutan yang rendah akan mengakibatkan depurinasi DNA dan menyebabkan senyawa tersebut terdistribusi ke dalam fase fenol selama deproteinisasi. Pada kondisi  $\text{pH}$  yang tinggi, di atas  $\text{pH} 12,0$ , juga merugikan, karena dapat mengakibatkan pemisahan untai DNA. Ketika Tris digunakan,  $\text{pH}$  bufer lisis harus dipertahankan pada kisaran  $\text{pH} 7,6$  hingga  $9,0$ , yang merupakan kisaran bufer yang paling efektif untuk senyawa ini.

Penggunaan bufer Tris dengan  $\text{pH}$  di bawah  $7,5$  tidak dianjurkan karena kapasitas penyangga yang dimilikinya sangat rendah. Namun, konsentrasi bufer tergantung pada jenis sel yang digunakan dalam preparasi DNA. Kerusakan sel dan jaringan hewan tidak secara drastis mengubah  $\text{pH}$  larutan, memungkinkan penggunaan konsentrasi bufer yang rendah. Sehingga, bufer Tris yang digunakan untuk pemecahan sel hewan, harus antara  $10 \text{ mM}$  dan  $50 \text{ mM}$  dengan  $\text{pH}$  antara  $8,0$  dan  $8,5$ . Preparasi DNA dari sel tanaman dan bakteri memerlukan konsentrasi bufer yang lebih tinggi. Hal ini karena dalam sel tersebut terkandung

Kekuatan ionik bufer lisis dapat dipertahankan dengan penambahan natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ).



**Gambar 1.3** Persenyawaan Tris dan  $\text{NaCl}$ .

metabolit sekunder dalam jumlah yang relatif besar. Bufer yang digunakan untuk pemecahan sel-sel ini harus berkisar antara  $100$  sampai  $200 \text{ mM}$  pada  $\text{pH}$  di atas  $\text{pH} 8,0$ .

Kekuatan ionik larutan penyangga dapat dipertahankan dengan penambahan natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ) (Gambar 1.3). Konsentrasi minimum  $\text{NaCl}$  harus sekitar  $0,12 \text{ M}$ . Konsentrasi garam ini cukup untuk mempertahankan struktur molekul DNA dan mengurangi jumlah air yang terdapat

---

dalam fase fenol, serta memfasilitasi deproteinisasi. Penggunaan konsentrasi garam yang sangat tinggi dalam larutan bufer lisis tidak dianjurkan, jika fenol akan digunakan untuk menghilangkan protein. Jumlah NaCl berlebih akan menghasilkan inversi fase organik dan air selama ekstraksi fenol berlangsung.

Di sisi lain, konsentrasi garam yang tinggi dalam bufer lisis diperlukan ketika prosedur detergen CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*) digunakan untuk lisis sel dan penghilangan protein. Hal ini karena DNA membentuk kompleks tidak larut yang stabil dengan CTAB pada konsentrasi garam  $\geq 0,5$  M. Ketika konsentrasi NaCl dipertahankan di atas 1,0 M, tidak terjadi pembentukan kompleks dan DNA tetap larut.

#### 1.4.2 Inhibitor DNase dan detergen

Dua jenis inhibitor DNase yang umum terdapat dalam bufer lisis adalah EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) dan detergen.

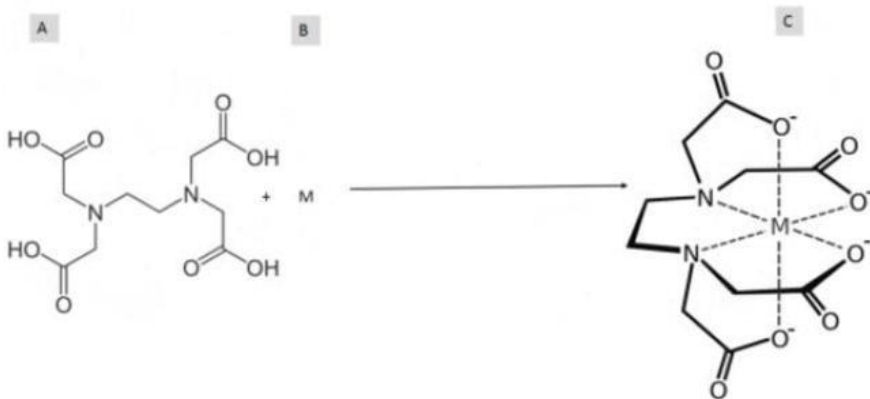
Seluruh bufer yang digunakan dalam isolasi DNA harus mengandung inhibitor DNase. Dua jenis inhibitor DNase yang umum digunakan adalah *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) dan detergen.

EDTA merupakan pengkhelat ion  $Mg^{++}$ , sekaligus sebagai penghambat DNA yang kuat (Gambar 1.4). Sebagian besar DNA seluler memerlukan ion tersebut sebagai kofaktor untuk aktivitasnya. Selain itu, kehadiran EDTA dalam bufer lisis dapat menghambat agregasi asam nukleat yang diinduksi ion  $Mg^{++}$ , satu sama lain dan terhadap protein. Konsentrasi EDTA yang berbeda digunakan dalam bufer lisis sangat bergantung pada jumlah ion DNase dan  $Mg^{++}$  yang terdapat di dalam sel.

Isolasi DNA dari sel bakteri, tumbuhan dan beberapa serangga memerlukan konsentrasi EDTA yang sangat tinggi, berkisar antara 0,1 hingga 0,5 M. Hal ini karena terdapat banyak enzim pengurai DNA di

---

dalam sel tersebut. Konsentrasi 50 hingga 100 mM EDTA umumnya cukup untuk menghambat DNase yang terdapat di dalam sel hewan. Sementara itu, konsentrasi EDTA yang tinggi (di atas 100 mM) dalam bufer yang digunakan untuk isolasi sel mamalia tidak direkomendasikan, karena dapat menyebabkan penurunan hasil secara nyata.



**Gambar 1.4** Aktivitas EDTA sebagai pengkhelat ion  $Mg^{++}$ : (A) Struktur EDTA; (B) Kation divalen bebas, seperti magnesium dan kalsium; (C) Reaksi pengkhelatannya.

Ketika EDTA konsentrasi tinggi digunakan, penting untuk diingat bahwa senyawa tersebut dapat mengendap dengan etanol. Pengendapan etanol, yang dapat digunakan untuk memekatkan DNA, dapat menghasilkan konsentrasi EDTA yang tinggi dalam sampel DNA. Oleh karena itu, akan didapatkan 'ketidakmurnian' atau 'kontaminan' dalam preparasi DNA yang dapat menghambat digesti DNA dengan enzim restriksi atau mengganggu aksi enzim pengubah DNA lainnya. Hal ini ternyata dipengaruhi oleh EDTA yang terbawa pada saat presipitasi etanol. Oleh karena itu pula, sangat penting untuk diperhatikan bahwa ketika mengendapkan DNA harus menggunakan



---

larutan yang relatif encer agar tidak mengendapkan EDTA, atau menggunakan prosedur pengendapan tanpa sentrifugasi.

Deterjen yang lazim digunakan dalam pemurnian DNA adalah SDS atau LDS, Sarkosil, dan CTAB.

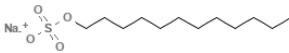
Selain EDTA, bufer lisis juga harus mengandung deterjen. Penggunaan deterjen bertujuan untuk menghambat DNase dan membantu melisis sel, serta mendenaturasi protein. Deterjen yang umum

digunakan dalam pemurnian DNA, adalah: *sodium* atau *lithium deodecyl sulfate* (SDS atau LDS), *sodium deodecyl sarcosinate* (Sarkosil), *sodium 4 amino salicylate*, *sodium tri-isopropyl naphthalene sulfonate*, dan *hexadecyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB).

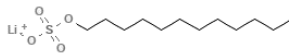
SDS dan LDS adalah deterjen anionik yang murah dan kuat untuk preparasi DNA.

***Sodium dodecyl sulfate* (SDS) dan *lithium dodecyl sulfate* (LDS)** adalah deterjen anionik yang murah dan kuat untuk digunakan dalam preparasi DNA (Gambar 1.5). Deterjen ini lazim digunakan pada konsentrasi antara 0,5 hingga 2,0%. Namun, SDS dan LDS memiliki kelemahan, yaitu dapat mengendap pada suhu rendah, memiliki kelarutan rendah dalam etanol 70% dan larutan yang memiliki kadar garam tinggi. SDS sangat sulit larut dalam garam cesium yang sering digunakan dalam

A



B



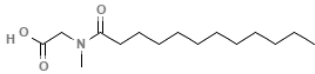
**Gambar 1.5** Struktur SDS (A) dan LDS (B)

pemurnian DNA menggunakan sentrifugasi gradien densitas. Kelarutan SDS yang lemah dalam etanol juga dapat mengakibatkan akumulasi deterjen dalam DNA yang diendapkan dan menyebabkan penghambatan enzim untuk tahap selanjutnya. Penggunaan garam *lithium deodecyl sulfate* dapat mengatasi permasalahan ini, karena garam tersebut memiliki kadar tinggi dan lebih larut dalam etanol daripada garam sodium/natrium.

---

**Catatan:** Bufer yang mengandung SDS atau LDS, serta larutan stoknya, tidak boleh disterilkan menggunakan autoklaf. Hal ini karena dapat menyebabkan pemendekan rantai alifatik, sekaligus menurunkan aktivitas deterjennya.

Sarkosil adalah garam sodium yang dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan SDS dalam isolasi DNA.



**Gambar 1.6** Struktur sarkosil

tidak mengendap pada suhu rendah dengan kehadiran etanol dan tidak terbawa ke dalam sampel DNA. Kelemahannya, hanya terletak pada aktivitas deterjen yang relatif lemah. Oleh karena itu, sarkosil harus digunakan sebanyak dua kali lipat dari konsentrasi efektif SDS. Selain itu, penggunaan sarkosil dalam bufer lisis juga harus dikombinasikan dengan SDS atau deterjen lain (dalam dosis rendah), terutama untuk sel yang relatif keras, seperti sel tumbuhan.

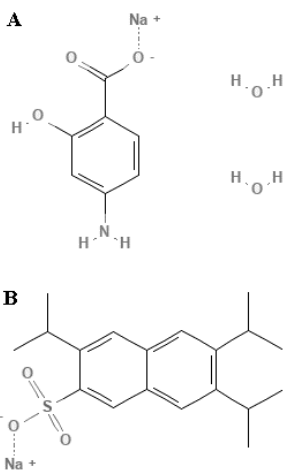
Sodium 4-aminosalicylate dan sodium tri-isopropyl naphthalene sulfonate adalah dua jenis deterjen yang dapat menghambat nuklease selama isolasi DNA.

**Sarkosil** (*N-laurylsarcosine*), termasuk garam sodium yang dapat digunakan untuk isolasi DNA (Gambar 1.6). Garam ini dapat mengatasi kelemahan SDS. Hal ini karena sarkosil mudah larut pada konsentrasi garam tinggi (khususnya garam cesium) dan sering digunakan ketika sentrifugasi densitas garam tersebut diperlukan untuk pemurnian DNA. Selain itu, deterjen ini

*Sodium 4-aminosalicylate* dan *sodium tri-isopropylnaphthalene sulfonate* adalah dua jenis deterjen yang tidak mengendap pada suhu rendah, bahkan pada konsentrasi yang sangat tinggi dapat larut sepenuhnya dalam etanol 70% (Gambar

1.7). Kedua jenis deterjen ini merupakan penghambat nuklease yang sangat baik dan sering digunakan secara bersama dengan SDS atau Sarkosil, terutama dalam isolasi DNA tanaman. Sodium 4-aminosalisilat

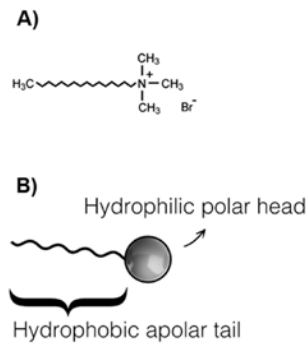
dapat digunakan sebagai pengganti sarkosil ketika sampel DNA diendapkan dengan n-butanol.



**Gambar 1.7** Struktur Sodium 4-aminosalicylate (A) dan sodium triisopropyl naphthalene sulfonate (B)

CTAB adalah deterjen kationik kuat yang dapat digunakan dalam melisis sel dan berperan sebagai penghambat DNase.

Kelemahan deterjen ini sama dengan sarkosil, yaitu aktivitas deterjennya yang agak lemah sehingga memerlukan konsentrasi yang sangat pekat (5-8%) ketika digunakan. Kedua deterjen ini dapat disterilkan dengan autoklaf.



**Gambar 1.8** Struktur molekul CTAB (A) dan karakter skematiknya (B)

*Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)* adalah deterjen kationik kuat yang dapat digunakan dalam melisis sel. Secara kimiawi, CTAB merupakan rantai hidrokarbon hidrofobik panjang yang memiliki kepala hidrofilik. Senyawa ini dapat membentuk misel dalam air karena sifat amfipatik (Gambar 1.8). Ketika melisis sel, senyawa ini dapat berperan sebagai penghambat DNase yang sangat baik, karena membentuk kompleks CTAB-protein yang tidak aktif secara enzimatik. CTAB digunakan pada konsentrasi antara 1% hingga 10% dalam pemurnian DNA, terutama pada sel tanaman dan bakteri. Deterjen ini larut dalam etanol 70%, tetapi dapat mengendap pada suhu

---

di bawah 15 °C. Kelemahan lain senyawa ini adalah memiliki viskositas tinggi dan kelarutan yang rendah dalam air (10% b/v pada suhu kamar).

CDA adalah deterjen kationik kuat yang dapat digunakan dalam melisis sel dan berperan sebagai penghambat DNase.

*Cetyltrimethylethyl ammonium bromide* (CDA), adalah deterjen kationik yang lazim digunakan sebagai antiseptik topis, dan merupakan substitusi yang sangat baik untuk CTAB. Deterjen ini sepenuhnya larut dalam air, tidak mengendap pada suhu rendah dan tidak

kental dalam larutan. Semua karakteristik CDA lainnya identik dengan CTAB. Namun memiliki kelemahan utama bersifat toksik dalam bentuk bubuk.

## 1.5 Tahap Isolasi DNA

Secara umum, isolasi DNA meliputi empat tahap utama, yaitu:

- Destruksi atau pemecahan sel (lisis).
- Penghilangan protein dan RNA.
- Pemisahan dan pemekatan DNA.
- Penentuan kemurnian dan kuantitas DNA.

### 1.5.1 Pemecahan (lisis) sel

Pemecahan sel adalah salah satu tahap terpenting dalam isolasi DNA. Tahap ini dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi dan enzimatik.

Pemecahan sel (lisis) adalah salah satu tahap terpenting dalam isolasi DNA. Tahap ini dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Pemecahan sel secara mekanik,

misalnya sonikasi, penggilingan (*grinding*), pencampuran (*blending*) atau tekanan tinggi (*high pressure*) tidak dianjurkan untuk preparasi DNA. Hal ini karena metode tersebut terlalu kuat untuk memecah sel sehingga dapat memotong DNA menjadi fragmen-fragmen berukuran kecil. Prosedur terbaik untuk memecah sel dan mendapatkan DNA utuh adalah melalui metode kimiawi (penggunaan deterjen) dan/atau

---

enzimatik. Deterjen dapat melarutkan lipid yang terdapat dalam membran sel dan melisiskan sel secara lembut. Selain itu, deterjen dapat menghambat DNAase seluler dan mengubah karakteristik protein, serta membantu menghilangkannya dari larutan.

Pada sel hewan, pemecahan sel umumnya dilakukan menggunakan deterjen anionik, seperti SDS atau sarkosil. Kedua deterjen ini dapat diaplikasikan untuk mengisolasi DNA dari sel yang dikulturkan. Namun, sebelum ditambahkan deterjen, sel-sel tersebut sebaiknya dibekukan terlebih dahulu menggunakan nitrogen cair, kemudian dihancurkan secara lembut menjadi potongan-potongan kecil.

Berbeda dengan sel tumbuhan dan bakteri, umumnya tidak dapat dihancurkan dengan deterjen saja. Untuk melisiskan sel-sel tersebut, aplikasi enzim harus dilakukan. Sebagai contoh pada sel bakteri, lisozim dapat diaplikasikan sebelum perlakuan deterjen. Pada sel tumbuhan, aplikasi enzim mungkin memerlukan waktu relatif lama dan tidak dapat menghilangkan dinding sel secara keseluruhan, karena mengandung selulosa. Oleh karena itu, lisis sel dapat dibantu secara mekanik menggunakan penggerusan secara lembut dalam nitrogen cair. Cara ini dapat menyebabkan retakan kecil pada dinding sel tumbuhan, sehingga memungkinkan deterjen untuk masuk ke dalam sel dan selanjutnya melisiskan membran sel.

Terdapat suatu pertanyaan yang menarik: "Mengapa Kirby menggunakan fenol dalam metode pemisahan protein dari larutan DNA?" Secara konsep, fenol membentuk kristal pada suhu kamar, tetapi ketika terdapat 20% air, senyawa tersebut membentuk larutan berair yang mengandung misel fenol yang dikelilingi molekul air. Sebagaimana telah dibahas, bahwa molekul protein umumnya mengandung beragam residu hidrofobik yang terkonsentrasi pada pusat molekulnya. Oleh karena itu, ketika larutan protein tersebut dicampur dengan fenol pada volume yang sama, maka beberapa molekul fenol akan terlarut dalam fase air (sekitar 20% air dan 80%

---

fenol). Namun, karena fenol sangat hidrofobik, maka senyawa tersebut cenderung lebih larut dalam inti hidrofobik protein daripada di dalam air. Akibatnya, molekul fenol dapat berdifusi ke dalam inti protein dan menyebabkan protein tersebut terdenaturasi. Dalam kondisi seperti ini, protein yang telah terdenaturasi (dengan gugus hidrofobik yang telah terpapar dan dikelilingi oleh misel fenol), akan jauh lebih mudah larut dalam fase fenol daripada fase air. Dengan demikian, sebagian besar protein dapat dipisahkan ke dalam fase fenol atau diendapkan pada interfase air. Sebaliknya, asam nukleat tidak memiliki gugus hidrofobik yang kuat dan tidak larut dalam fenol.

### 1.5.2 Penghilangan protein

Penghilangan protein dari cairan lisis atau 'lisat' disebut deproteinisasi.

Tahap kedua dalam pemurnian DNA adalah penghilangan protein dari cairan lisis atau 'lisat'. Tahap ini disebut **deproteinisasi**. Penghilangan protein dari larutan DNA tergantung pada perbedaan asam nukleat dan protein secara fisik, meliputi: perbedaan kelarutan (solubilitas), volume spesifik secara parsial dan sensitivitas terhadap enzim digesti. Sementara itu, metode yang berkaitan dengan perbedaan kelarutan, meliputi: perbedaan kelarutan pelarut organik, garam atau deterjen kompleks dan absorpsinya terhadap permukaan bermuatan.

#### 1.5.2.1 Deproteinisasi menggunakan pelarut organik

Protein merupakan senyawa polimer asam amino yang dapat larut dalam pelarut organik, seperti fenol atau kloroform.

Sebagian besar asam nukleat merupakan molekul hidrofilik dan mudah larut dalam air. Di sisi lain, protein merupakan senyawa polimer asam amino yang mengandung beragam residu hidrofobik sehingga sebagiannya larut dalam pelarut organik. Berdasarkan perbedaan tersebut, terdapat beberapa metode

---

deproteinisasi yang sangat berbeda terkait pemilihan pelarut organik. Pelarut organik yang paling umum digunakan adalah fenol atau kloroform yang mengandung isoamil alkohol 4%. Penggunaan fenol sebagai agen deproteinisasi pertama kali diperkenalkan oleh Kirby (1957), sehingga lazim disebut **metode Kirby**. Empat tahun setelah itu, Marmur (1961) menggunakan campuran kloroform-isoamil alkohol pada proses deproteinisasi, sehingga dikenal dengan **metode Marmur**. Kedua metode ini telah mengalami banyak perubahan (modifikasi) semenjak publikasi mereka diterbitkan.

Dalam metode Kirby diperlukan pencampuran fase fenol dengan air, meskipun hal ini dapat menyebabkan pemotongan molekul DNA.

Metode Kirby memerlukan pencampuran fase fenol dengan air. Meskipun hal ini dapat menyebabkan pemotongan molekul DNA. Oleh karena itu, sejumlah kecil protein yang dapat larut dalam fenol, maka ekstraksi harus dilakukan secara berulang untuk

menghilangkan seluruh protein. Lebih lanjut, karena fase fenol pada saturasi mengandung 20% air, maka setiap ekstraksi fenol akan menghilangkan sekitar 20% DNA ke dalam fase tersebut. Bahkan, DNA akan lebih banyak hilang karena terperangkap dalam lapisan interfase protein yang diendapkan atau ketika pH fenol turun dibawah pH 8,0. Kelemahan lain metode Kirby terletak pada produk oksidasi fenol dapat bereaksi secara kimiawi dengan molekul DNA (termasuk RNA). Selain itu, fenol sangat beracun dan memerlukan penanganan khusus dalam pembuangannya.

Namun, pengaruh-pengaruh tersebut dapat diperkecil melalui beberapa modifikasi (lihat Kotak 1.3). DNA yang diperoleh dengan metode Kirby yang telah dimodifikasi umumnya memiliki berat molekul tinggi, tetapi mengandung sekitar 0,5% kontaminan protein yang dapat dihilangkan melalui metode lain.

---

Dalam metode Marmur, digunakan campuran kloroform-isoamil (CIA) untuk menghilangkan protein.

Dalam **metode Marmur**, penggunaan campuran kloroform-isoamil (CIA) didasarkan pada perbedaan karakteristik pelarut organiknya. Kloroform tidak larut dengan air, oleh karena itu, dalam proses ekstraksinya DNA tidak mudah rusak.

Deproteinisasi kloroform didasarkan pada kemampuannya untuk mendenaturasi rantai polipeptida dengan cara masuk atau memobilisasinya pada interfase air-kloroform. Protein konsentrasi tinggi yang dihasilkan pada interfase menyebabkan senyawa tersebut mengendap. Karena aksi deproteinisasi kloroform terjadi pada interfase kloroform:air, maka efisiensi proses tersebut dapat dicapai melalui pengocokan secara kuat untuk membentuk emulsi air dan kloroform. Dalam hal ini, isoamil alkohol berperan sebagai emulsifier yang dapat membantu pembentukan emulsi serta meningkatkan luas permukaan air-kloroform, yang di dalamnya protein akan mengendap. Metode ini sangat efisien untuk mencegah kerusakan DNA dan mendapatkan DNA murni, namun karena kapasitasnya relatif terbatas untuk menghilangkan protein, maka diperlukan ekstraksi secara berulang. Metode Marmur juga berguna untuk preparasi DNA virus yang memiliki ukuran genom kecil.

Peningkatan metode Marmur dapat dicapai secara substansial melalui pembatasan jumlah ekstraksi. Hal ini dapat menghemat waktu dan mengurangi pemutusan rantai DNA. Modifikasi Marmur juga dapat dilakukan melalui penghilangan sebagian besar protein secara enzimatik sebelum ekstraksi kloroform isoamil berlangsung. Modifikasi lain yang sering digunakan adalah penggabungan ekstraksi fenol dan kloroform dalam satu langkah (*one-step*).



---

### **Kotak 1.3** Beberapa modifikasi dalam metode Kirby

- Gunakan deterjen ionik. Deterjen ini bekerja dengan cara membuka lipatan protein, kemudian mengeluarkan daerah hidrofobik rantai polipeptida ke dalam misel fenol, sekaligus membantu pemisahan (partisi) protein ke dalam fase fenol.
- Hilangkan protein secara enzimatis sebelum dilakukan ekstraksi fenol. Hal ini dapat mengurangi jumlah ekstraksi yang dilakukan, sehingga membatasi kehilangan dan pemotongan DNA.
- Tambahkan 8-hidroksikuinolin ke dalam fenol. Penambahan senyawa ini dapat meningkatkan kelarutan fenol dalam air. Dengan adanya senyawa ini, fenol tetap dapat dilarutkan pada suhu kamar dengan hanya menggunakan 5% air. Selain itu, 8-hidroksikuinolin mudah teroksidasi sehingga berperan sebagai antioksidan, sekaligus melindungi fenol dari oksidasi tersebut. Karena bentuk tereduksi 8-hidroksikuinolin berwarna kuning, sementara bentuk teroksidasinya tidak berwarna, maka ada atau tidak adanya warna kuning tersebut merupakan indikator visual yang sangat baik untuk menunjukkan terjadinya oksidasi fenol.
- Hilangkan produk oksidasi dari fenol dan cegahlah oksidasi pada penyimpanan atau selama ekstraksi fenol. Karena fenol jenuh air akan lebih mudah teroksidasi terutama dengan adanya bufer lisis seperti Tris, maka fenol yang akan digunakan untuk pemurnian DNA harus didestilasi terlebih dulu sebanyak dua kali, kemudian diseimbangkan dengan air dan disimpan dalam 8-hidroksikuinolin 0,1%.
- Sesuaikan larutan fenol jenuh air hingga di atas pH 8,0, dengan cara menyeimbangkan larutan tersebut menggunakan bufer kuat atau natrium borat (NaBr).
- Ganti fenol dengan reagen serupa yang tidak beracun, seperti ProCipitate" atau StrataClean Resin® (CPG Inc; Stratagene Inc.).

---

**Catatan:** Metode Kirby dan Marmur dapat diaplikasikan secara efisien dan efektif untuk menghilangkan protein dari sampel DNA (dan RNA) dengan penambahan enzim digesti terlebih dulu. Metode ini dapat digunakan tanpa langkah pendahuluan, hanya jika sejumlah kecil protein mengkontaminasi larutan DNA.

### 1.5.2.2 Deproteinisasi menggunakan formasi kompleks

CTAB dan garam kalium atau natrium sering digunakan dalam deproteinisasi, karena dapat membentuk kompleks dengan asam nukleat, protein, dan polisakarida.

Metode ini didasarkan pada sifat beberapa senyawa atau deterjen untuk membentuk kompleks yang tidak larut dengan protein atau DNA, serta komponen sel lainnya. Senyawa yang paling sering digunakan adalah CTAB dan garam kalium atau natrium yang berasal

dari etil xantogenat (asam karbonoditioat, o-etil ester).

CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*) atau CDA (*cetyldimethylethyl amonium bromide*) dapat membentuk kompleks dengan asam nukleat, protein, dan polisakarida. Pada konsentrasi NaCl tinggi 1,0 M atau lebih, asam nukleat tidak membentuk kompleks dengan CTAB (CDA) dan tetap larut dalam air. Sedangkan kompleks dengan protein dan polisakarida terbentuk. Kompleks ini tidak larut dalam air. Kompleks yang tidak larut dapat dihilangkan dari larutan melalui sentrifugasi atau dengan ekstraksi CIA tunggal, menyisakan DNA dalam fase air. DNA dikoleksi dari fase air dengan pengendapan etanol, dan sisa CTAB (CDA) dihilangkan dari DNA yang diendapkan dengan mencuci dengan etanol 70%. Dalam hal ini, keberhasilan aplikasi CTAB (CDA) sangat bergantung pada tiga faktor, yaitu: konsentrasi larutan garam, penyimpanan dalam suhu kamar dan pencampuran deterjen (Kotak 1.4).

---

#### **Kotak 1.4** Faktor yang mempengaruhi aplikasi CTAB (CDA)

- Konsentrasi larutan garam (NaCl). Lisat harus mengandung NaCl dengan konsentrasi 1,0 M atau lebih untuk mencegah terjadinya pembentukan kompleks CTAB:DNA yang tidak larut. Karena jumlah air yang ada dalam pelet sel sulit untuk diukur, maka larutan lisis yang mengandung CTAB (CDA) harus disesuaikan hingga memiliki konsentrasi minimal NaCl 1,4 M.
- Penyimpanan dalam suhu kamar. Semua larutan dan ekstrak sel yang mengandung CTAB harus disimpan pada suhu kamar, karena kompleks CTAB dan CTAB:DNA tidak larut pada suhu di bawah 15°C. Secara khusus, hal ini sangat penting untuk langkah-langkah sentrifugasi dan pencucian etanol. Secara umum, jika prosedur deproteinisasi lain digunakan, maka sentrifugasi dan pencucian dilakukan masing-masing pada suhu 4 °C dan -20 °C. Oleh karena itu, jika kondisi ini diterapkan pada prosedur CTAB maka akan mengakibatkan hilangnya DNA secara total.
- Pencampuran detergen. Tidak semua preparasi CTAB yang tersedia secara komersial bekerja dengan baik dalam kondisi ini. Oleh karena itu, preparasi menggunakan campuran CDA atau CTAB diharapkan dapat memberikan hasil yang memuaskan. Namun, penggunaan beberapa preparat lain yang memiliki kemurnian sangat tinggi, justru dapat menghasilkan DNA dengan kualitas sangat rendah dan sering terkontaminasi polisakarida.

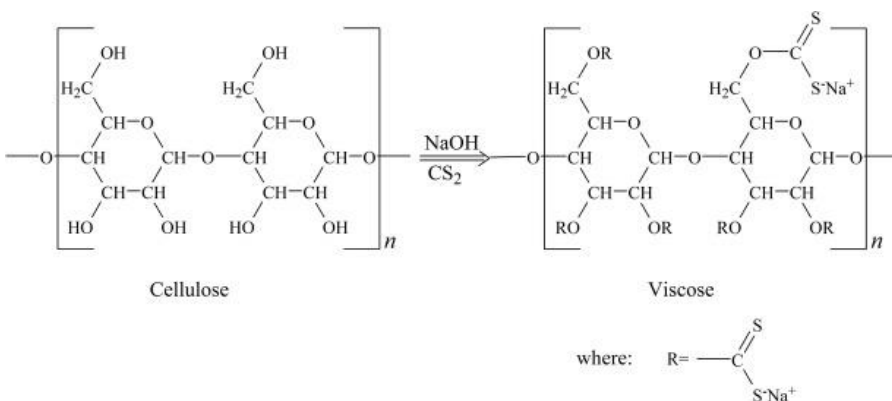
Secara singkat, aplikasi CTAB atau CDA sering digunakan untuk pemurnian DNA dan penghilangan polisakarida secara efisien dari sumber yang mengandung polisakarida tinggi, misalnya sel tumbuhan dan bakteri gram negatif, seperti *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, dan *Bradyrhizobium*. Dalam hal ini, untuk menghilangkan polisakarida dari sampel DNA, maka larutan CTAB atau CDA harus disesuaikan konsentrasinya sekitar 1% dengan penambahan NaCl sebesar 0,7 M hingga 1,0 M. Setelah itu, ekstraksi dilakukan dengan campuran

kloroform:isoamil. DNA yang didapatkan kemudian diendapkan dan dicuci menggunakan etanol. Tahap ini dapat dilakukan berulang kali hingga semua polisakarida hilang. Munculnya endapan putih (seperti tepung) pada interfase air:kloroform, menunjukkan adanya polisakarida.

Garam potasium (kalium) atau sodium (natrium) yang berasal dari etil xantogenat dapat diaplikasikan dalam pemurnian DNA, terutama dari sel tumbuhan, karena dapat melarutkan selulosa.

Garam potasium (kalium) atau sodium (natrium) yang terkandung dalam etil xantogenat merupakan senyawa yang telah lama digunakan dalam industri kertas, karena

mampu melarutkan alkohol polihidrat, seperti selulosa. Beberapa tahun terakhir, kedua garam ini telah diaplikasikan dalam pemurnian DNA, terutama dari sel tumbuhan karena kemampuannya melarutkan selulosa. Xantogenat sendiri dapat bereaksi dengan gugus hidroksil polisakarida membentuk xantat polisakarida yang larut dalam air (Gambar 1.9). Pada kondisi demikian, sel tumbuhan mudah dilisiskan oleh deterjen. Xantat juga dapat bereaksi dengan gugus amina dari protein dan RNA untai tunggal, sehingga membentuk kompleks yang tidak larut dalam air, tetapi tidak bereaksi dengan DNA untai ganda.



**Gambar 1.9** Persenyawaan xantat dengan polisakarida (selulosa)

---

Protein tidak larut atau RNA xantat dapat dihilangkan melalui sentrifugasi, sedangkan DNA melalui pengendapan etanol.

Protein tidak larut atau RNA xantat dapat dihilangkan melalui sentrifugasi. Sementara itu, DNA dapat dipisahkan dari selulosa xantat yang larut dalam air melalui pengendapan etanol. DNA yang diisolasi menggunakan metode ini relatif bebas kontaminan, seperti polisakarida, fenolik,

senyawa logam berat, protein, dan RNA untai tunggal, sehingga cocok untuk analisis digesti enzim restriksi dan analisis PCR. Kontaminan lain yang mungkin tersisa adalah RNA untai ganda, tetapi senyawa ini dapat dihilangkan dengan perlakuan RNase.

### 1.5.2.3 Deproteinisasi menggunakan pengikatan silika

Dalam konsentrasi garam tinggi, DNA akan terikat dengan silika, sedangkan protein tidak terikat.

Jika konsentrasi garam tinggi, maka DNA akan berikatan dengan permukaan silika. Sedangkan protein, karena sifat hidrofobiknya yang dominan terhadap garam tinggi, maka senyawa ini tidak akan

terikat. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Vogelstain & Gillespie (1979), menggunakan manik-manik kaca yang dicuci dengan asam sebagai sumber silika. DNA yang terikat kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran dan dilarutkan dari manik-manik kaca dengan menurunkan konsentrasi garam. Secara umum, garam yang digunakan dalam metode ini adalah NaCl 0,1 M, sedangkan pencucian menggunakan etanol 50%.

Deproteinisasi menggunakan pengikatan silika relatif sederhana dibandingkan metode ekstraksi lainnya.

Deproteinisasi menggunakan pengikatan silika relatif sederhana dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Namun, metode ini memiliki banyak kelemahan, terutama dalam aplikasinya.

Pertama, relatif kompleks (sulit) jika digunakan pada volume cairan

---

yang besar, sehingga tidak praktis untuk isolasi DNA skala besar. Kedua, DNA yang dihasilkan relatif rendah, berkisar antara 50% sampai 75% dari bahan awal. Ketiga, DNA yang memiliki berat molekul besar secara umum terpotong menjadi fragmen-fragmen berukuran kecil (kurang dari 5 kb), karena terikat pada partikel silika.

Aktivasi permukaan partikel dan pembuatan partikel silika yang lebih besar dan seragam merupakan modifikasi untuk meningkatkan kapasitas pengikatan dan mencegah pemotongan DNA.

Sejumlah modifikasi telah dilakukan untuk memperbaiki metode ini, terutama dengan memodifikasi partikel silika untuk mengikat DNA. Modifikasi pertama adalah dengan mengaktifkan permukaan partikel untuk meningkatkan kapasitas pengikatan

DNA. Modifikasi berikutnya adalah pembuatan partikel yang lebih besar dan seragam untuk mencegah pemotongan DNA. Selain itu, membran partikel silika juga digunakan untuk memfasilitasi penghilangan protein secara cepat melalui sentrifugasi membran. Modifikasi ini memungkinkan untuk mengisolasi DNA berukuran besar (hingga 50 kb) dengan tingkat keberhasilan mendekati 70-80%.

Metode ini juga telah dimodifikasi dan diaplikasikan untuk isolasi fragmen DNA dari gel agarosa. Dalam modifikasi ini, garam chaotropic, seperti natrium iodat atau natrium perklorida, dapat digunakan untuk melarutkan agarosa dan mengikat DNA ke bagian permukaan silika. Modifikasi silika lainnya untuk pemurnian DNA adalah dengan memasukkan gugus hidroksi asam pada senyawa tersebut. Silika terhidroksilasi, pada pH netral atau mendekati netral, memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap protein dibandingkan asam nukleat. Perusahaan Gen Strata Co. telah memperkenalkan produk metode ini secara komersial dalam bentuk bubuk partikel silika terhidroksilasi, dikenal sebagai 'StrataClean Resin®'.

Pencampuran bubuk silika dengan fase cair yang mengandung DNA dan protein akan menghasilkan ikatan protein-silika, sekaligus

---

meninggalkan DNA dalam fase tersebut. Selanjutnya, fase dipisahkan melalui sentrifugasi dengan cara yang mirip ekstraksi fenol. Untuk benar-benar menghilangkan protein dari sampel, maka ekstraksi harus dilakukan dua kali atau lebih.

Keuntungan lain aplikasi StrataClean Resin® dibandingkan fenol adalah tidak beracun, sehingga aman digunakan. Namun, metode ini juga memiliki keterbatasan, diantaranya: memerlukan banyak ekstraksi dan biaya yang relatif besar, terutama jika diterapkan pada volume sampel yang besar. Modifikasi yang dapat dilakukan pada metode ini, adalah perlakuan menggunakan protease sebelum ekstraksi dilakukan. Modifikasi ini menjadikan penggunaan StrataClean Resin® relatif lebih murah dan praktis, serta meningkatkan kemurnian dan kuantitas DNA yang diisolasi.

#### 1.5.2.4 Deproteinisasi menggunakan perbedaan volume spesifik parsial

Perbedaan volume spesifik parsial suatu senyawa, baik DNA dan protein dapat dijadikan dasar dalam deproteinisasi.

Volume spesifik-parsial, yaitu volume yang ditempati oleh satu gram senyawa, secara umum sangat bergantung pada bentuk molekul.

Volume spesifik-parsial sebagian besar protein, terutama molekul globular, berkisar antara 0,70 hingga 0,73 cm<sup>3</sup>/g. Sementara itu, volume spesifik parsial DNA, molekul berbentuk batang, adalah 0,55 cm<sup>3</sup>/g, nilai yang jauh lebih kecil daripada protein. Adanya perbedaan volume spesifik-parsial dari molekul-molekul ini dapat dimanfaatkan dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas. Massa jenis senyawa tertentu didefinisikan sebagai berat 1 cm<sup>3</sup> senyawa ini (g/cm<sup>3</sup>), merupakan nilai timbal balik dari volume spesifik parsialnya. Oleh karena itu, kerapatan protein dalam air berkisar antara 1,36 g/cm<sup>3</sup> hingga 1,42 g/cm<sup>3</sup>, sedangkan kerapatan DNA sekitar 1,818 g/cm<sup>3</sup>.

---

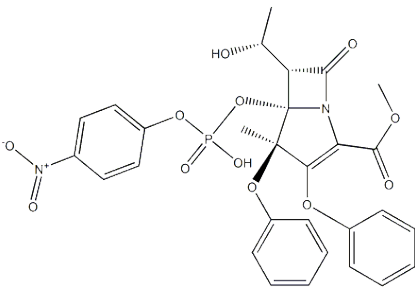
Selain itu, karena volume spesifik-parsial RNA atau DNA untai tunggal (ssDNA) berbeda dari DNA untai ganda (dsDNA), maka perbedaan ini juga bermanfaat untuk memisahkan molekul-molekul tersebut dari DNA dan protein, atau satu sama lain. Untuk membuat gradien densitas supaya pemisahan terjadi, maka garam cesium (klorida atau sulfat) dapat digunakan untuk menghasilkan gradien yang terbentuk sendiri selama sentrifugasi kecepatan tinggi berlangsung. Namun, sentrifugasi kecepatan tinggi dan waktu yang relatif lama dalam pembuatan gradien serta pemisahan molekul, merupakan pembatas metode ini.

### 1.5.2.5 Deproteinisasi menggunakan perbedaan sensitivitas enzim

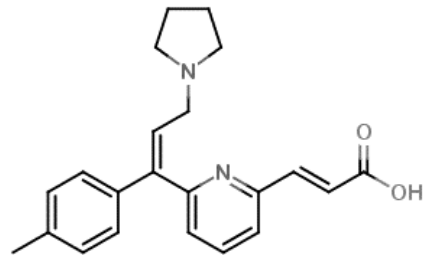
Protein dapat dihilangkan dari preparat DNA atau RNA menggunakan enzim protease.

Protein dan asam nukleat adalah molekul biologis yang sangat berbeda untuk dikenali oleh enzim digesti yang berbeda dan sangat spesifik. Protein dapat dihilangkan dari preparat DNA atau RNA

menggunakan protease yang dapat mendigesti semua protein. Dua enzim tersebut adalah Proteinase K (Gambar 1.10) dan Pronase (Gambar 1.11). Kedua enzim tersebut sangat stabil dan memiliki spesifisitas umum protease yang disekresikan oleh jamur. Sediaan komersial enzim ini relatif tidak mahal dan tanpa kontaminasi DNase, menjadikannya



**Gambar 1.10** Struktur molekul Proteinase K



**Gambar 1.11** Struktur molekul Pronase.



---

aman untuk digunakan dalam pemurnian asam nukleat. Protease ini aktif dengan kehadiran deterjen anionik konsentrasi rendah, garam konsentrasi tinggi dan EDTA. Enzim ini juga menunjukkan kisaran pH yang luas (6-10) dan suhu optimal antara 50-67°C.

Kelebihan lain enzim ini adalah dapat mendigesti protein utuh (globular) dan mendenaturasi rantai polipeptida, serta tidak memerlukan kofaktor dalam aplikasinya. Proteinase K dan Pronase lazim digunakan dalam prosedur pemurnian DNA pada konsentrasi akhir 0,1 hingga 0,8 mg/ml dan larutan stok dapat disimpan dalam gliserol 50% pada suhu -20°C untuk waktu yang tidak ditentukan. Perbedaan mendasar antara kedua enzim ini terletak pada aktivitas spesifik yang dimilikinya. Pronase adalah enzim yang dapat mendigesti sendiri, sedangkan Proteinase K tidak. Fakta bahwa Proteinase K bukanlah enzim yang dapat mendigesti sendiri menjadikannya lebih nyaman digunakan daripada Pronase, karena tidak perlu ditambahkan secara terus-menerus selama berlangsungnya reaksi.

Kelemahan utama enzim proteinase K adalah kemampuan katalitiknya hanya dapat menghilangkan 80-90% protein.

Kelemahan utama enzim ini untuk deproteinisasi adalah kemampuan enzimatisnya hanya dapat menghilangkan 80 sampai 90% dari protein yang ada. Hal ini karena digesti protein adalah reaksi enzimatik yang

sangat bergantung pada substrat dan konsentrasi enzim. Dalam prakteknya, laju deproteinisasi hanya bergantung pada konsentrasi protein (substrat), karena tidak praktis untuk menambahkan sejumlah besar enzim untuk mempercepat reaksi pada konsentrasi substrat yang rendah. Oleh karena itu, saat reaksi berlangsung, konsentrasi substrat akan menurun secara drastis dan menyebabkan perlambatan laju reaksi. Secara konsep, reaksi enzimatik akan selesai pada waktu yang tidak terbatas. Oleh karena itu, pada konsentrasi substrat yang tinggi dan

---

konsentrasi enzim yang cukup, reaksi akan berlangsung dengan kecepatan maksimal hingga 80-90%.

**Catatan:** Deproteinisasi enzimatis harus dilakukan tepat setelah lisis sel, terutama ketika kontaminan protein terdapat dalam jumlah besar. Karakteristik penghilangan protein secara enzimatis ini menjadikan digesti protease sebagai langkah ideal dan sangat diperlukan dalam pemurnian asam nukleat.

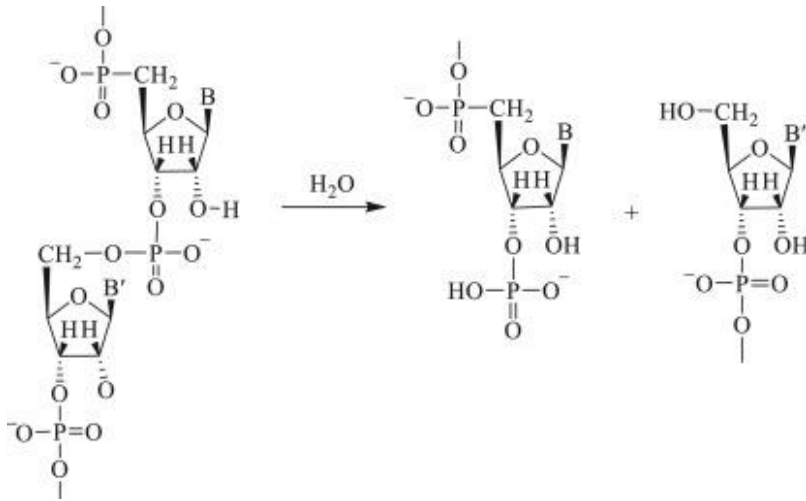
### 1.5.3 Penghilangan RNA

RNA dapat dihilangkan secara enzimatis menggunakan ribonuclease A dan ribonuclease T1.

Penghilangan RNA saat preparasi DNA umumnya dilakukan secara enzimatis. Oleh karena itu, dalam metode ini, materi RNA tidak sepenuhnya hilang, atau masih tersisa dalam jumlah kecil sebagai kontaminan.

Untuk mengatasi hal tersebut, maka dua senyawa ribonuklease yang relatif mudah dan murah, yaitu **ribonuclease A** dan **ribonuclease T1**, dapat diaplikasikan.

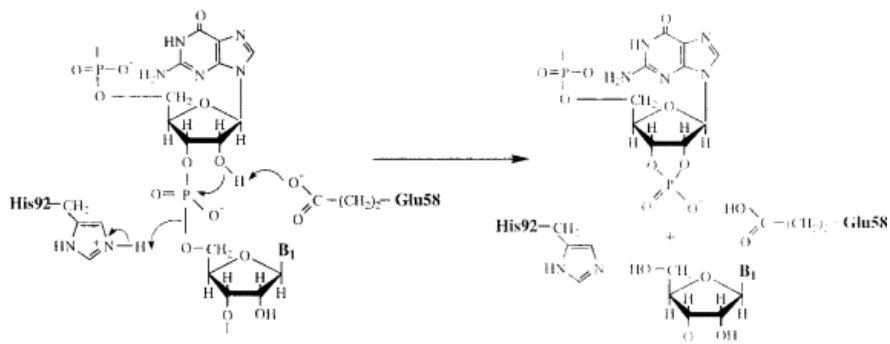
**Ribonuklease A** (RNase A), diisolasi dari pankreas sapi, merupakan endoribonuklease yang dapat memotong untai RNA pada posisi residu C dan U (Gambar 1.12). Reaksi pemotongan tersebut menghasilkan 2':3' fosfat siklik yang dapat dihidrolisis menjadi 3'-nukleosida fosfat dan menghasilkan oligonukleotida yang diakhiri dengan 3' nukleotida pirimidin terfosforilasi. Enzim dapat bekerja secara aktif dalam berbagai kondisi yang sangat luas, misalnya dengan kehadiran deterjen, suhu tinggi, adanya residu fenol, dan lain-lain. Disamping itu, enzim ini relatif sulit diinaktivasi atau dinonaktifkan. Pada konsentrasi NaCl di bawah 0,3 M, enzim dapat memotong RNA untai tunggal dan ganda, tetapi pada konsentrasi garam tinggi (di atas 0,3 M) enzim hanya dapat memotong RNA untai tunggal.



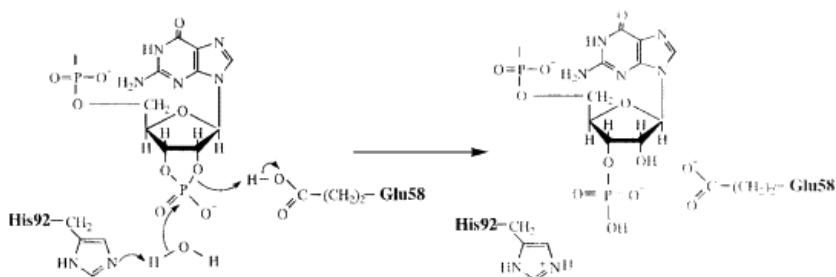
**Gambar 1.12** Pemotongan RNA oleh RNase A.

**Ribonuclease T1** (RNase T1), diisolasi dari *Aspergillus oryzae* merupakan endoribonuclease yang sangat mirip dengan RNase A, baik dalam kondisi reaksi dan stabilitasnya (Gambar 1.13). Enzim ini dapat memotong RNA untai ganda dan tunggal setelah residu G, dan menghasilkan oligonukleotida yang diakhiri dengan nukleotida guanosis terfosforilasi 3'. Pada konsentrasi NaCl tinggi, seperti halnya pada RNase A, enzim ini hanya aktif untuk RNA untai tunggal. Dengan demikian, tindakan pencegahan yang sama dalam penggunaannya harus diterapkan seperti yang dijelaskan untuk RNase A.

**Catatan:** Berkaitan dengan spesifisitas pemotongan RNA oleh enzim-enzim yang berbeda, maka direkomendasikan untuk menggunakan kedua enzim tersebut secara bersama-sama untuk menghilangkan RNA secara menyeluruh dari sampel DNA. Dengan kata lain, penggunaan salah satu enzim saja pada tahap ini dapat mengakibatkan kontaminasi pada sampel DNA dan menyulitkan pengukuran konsentrasinya menggunakan spektrofotometri.



(b)



**Gambar 1.13** Reaksi RNase T1 pada tahap transfosforilasi (a) dan hidrolisis (b).

### 1.5.4 Presipitasi DNA

Presipitasi DNA dapat dilakukan menggunakan alkohol dan dialisis, serta senyawa yang dapat menyerap air.

Secara umum, tahap pemurnian DNA meliputi dua tujuan utama. **Pertama**, untuk memisahkan dan mengumpulkan DNA yang memiliki berat molekul tinggi dari larutan deproteinisasi. **Kedua**, menghilangkan nukleotida, asam amino, dan senyawa kontaminan lainnya yang memiliki berat molekul rendah yang tersisa dalam larutan setelah lisis sel. Tahap ini dapat diimplementasikan melalui dua cara, yaitu: (1) presipitasi DNA menggunakan alkohol dan dialisis, dan (2) pemekatan menggunakan beberapa senyawa yang dapat menyerap air.

---

#### 1.5.4.1 Presipitasi DNA menggunakan alkohol



**Gambar 1.14** Ilustrasi DNA yang dikelilingi molekul air.

Etanol adalah jenis alkohol yang lazim digunakan dalam presipitasi DNA.

Presipitasi alkohol ini didasarkan pada fenomena menurunnya solubilitas asam nukleat di dalam air. Molekul air yang bersifat polar terdapat disekitar DNA dan larutan air tersebut. Muatan positif dua ion hidrogen dari molekul air akan berinteraksi secara kuat dengan muatan negatif gugus fosfodiester senyawa DNA. Interaksi ini menyebabkan solubilitas DNA di dalam air. Gambar 1.14 mengilustrasikan fenomena tersebut.

Berikut adalah tiga jenis alkohol yang dapat digunakan dalam presipitasi DNA, yaitu: **Etanol**, **Isopropanol** dan **Butanol**.

**Etanol** ( $\text{EtOH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) adalah jenis alkohol yang lazim digunakan dalam presipitasi DNA. Senyawa ini mudah menguap dan sepenuhnya dapat larut dalam air, tetapi memiliki polaritas jauh lebih rendah dibandingkan molekul tersebut. Secara umum, dalam presipitasi DNA, diperlukan etanol konsentrasi tinggi sekitar 70 persen volume (atau 2,5 kali lipat peningkatan volume larutan DNA yang akan diendapkan). Secara konsep, molekul etanol tidak dapat berinteraksi secara kuat dengan gugus polar dari senyawa asam nukleat, menjadikannya sebagai pelarut yang sangat rendah untuk asam nukleat. Oleh karena itu, menggantikannya dengan 95% molekul air, dapat menyebabkan DNA terpresipitasi. Namun, untuk membuat larutan DNA yang memiliki konsentrasi etanol 95% tidak praktis karena memerlukan penambahan volume etanol 100% relatif besar terhadap larutan DNA. Untuk mempresipitasi DNA pada konsentrasi etanol lebih rendah, maka aktivitas molekul air harus diturunkan. Hal ini dapat dilakukan melalui

---

penambahan garam terhadap larutan DNA. Disamping itu, kehadiran garam dalam larutan ini akan mengubah derajat muatan atas netralisasi gugus fosfat DNA, sekaligus menimbulkan perubahan yang luas terhadap sifat hidrodinamika molekul tersebut.

Secara umum, presipitasi etanol dilakukan pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau lebih rendah. Hal ini didasarkan karena pada suhu rendah dan adanya garam, aktivitas molekul air akan menurun dan memfasilitasi pengendapan DNA secara lebih efisien. Namun, analisis yang cermat terhadap efisiensi presipitasi DNA pada berbagai suhu dan konsentrasi DNA, menunjukkan bahwa langkah ini dapat dilakukan pada suhu kamar tanpa kehilangan DNA yang berarti, bahkan ketika konsentrasi DNA dalam sampel sangat rendah. Perolehan DNA terbaik (pada konsentrasi sekitar 5 sampai 5000 ng/ml) diperoleh saat inkubasi yang dilakukan pada suhu kamar atau  $4^{\circ}\text{C}$ . Sementara itu, perolehan DNA terburuk, ketika larutan disimpan pada  $-70^{\circ}\text{C}$ . Oleh karena itu, tidak dianjurkan untuk mengendapkan DNA pada suhu rendah.

Isopropanol memiliki efektivitas lebih tinggi daripada etanol dalam presipitasi DNA.

**Isopropanol** ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ) memiliki efektivitas lebih tinggi daripada etanol dalam presipitasi DNA. Keunggulan isopropanol terhadap etanol terletak pada penggunaan konsentrasi yang lebih rendah dalam presipitasi DNA (sekitar 0,6 hingga 0,8 persen volume). Molekul DNA akan terpresipitasi oleh isopropanol pada konsentrasi 50% menggunakan kadar garam yang sama dengan etanol. Disamping itu, pada suhu ruang dan konsentrasi isopropanol seperti ini, fragmen DNA yang berukuran kecil akan terpresipitasi sangat sedikit. Sementara itu, kelemahan penggunaan isopropanol adalah sulitnya menghilangkan senyawa tersebut dari sampel, karena memiliki volatilitas yang lebih rendah dibandingkan etanol. Oleh karena itu, setelah presipitasi isopropanol sangat direkomendasikan untuk melakukan beberapa kali pencucian menggunakan etanol 70% (v/v) terhadap pelet DNA yang dihasilkan.

Butanol, juga cocok untuk presipitasi DNA, meskipun fungsinya sangat berbeda dengan etanol dan isopropanol.

**Butanol** ( $C_4H_9OH$ ), juga cocok untuk presipitasi DNA, meskipun fungsinya sangat berbeda. Senyawa ini hampir tidak dapat bercampur dengan air, sehingga terbentuk dua fase. Fase butanol dapat

melarutkan sejumlah kecil garam, dalam jumlah air yang sedikit (hingga 19 persen volume). Oleh karena itu, fase ini dapat digunakan untuk desalinasi pada volume yang lebih kecil. Suatu volume larutan DNA dapat larut dalam 10 kali lipat volume butanol, baik 1- atau 2-butanol (sama efektifnya). Pencampuran dilakukan selama 1 hingga 5 menit, sampai fase berair menghilang. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dan pencucian menggunakan etanol 70%, hingga pelet DNA terbebas dari air.

Beberapa jenis garam dapat digunakan dalam presipitasi DNA, seperti natrium klorida, natrium asetat, amonium asetat, lithium klorida, serta kalium klorida dan kalium asetat.

Beberapa jenis garam juga dapat diaplikasikan dalam presipitasi DNA, secara bersama dengan alkohol. Tabel 1.3 menyajikan jenis garam dan konsentrasi (akhir) untuk pengendapan DNA dalam etanol 70%. Penggunaan garam, seperti tercantum pada Tabel 1.2, memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing.

**Tabel 1.2** Jenis dan kadar garam yang digunakan dalam presipitasi DNA.

Garam	Konsentrasi larutan stok	Konsentrasi akhir
Natrium klorida (NaCl)	2,0 M	0,2 M
Natrium asetat	3,0 M	0,3 M
Amonium asetat	7,5 M	2,0 - 2,5 M
Litium klorida	8,0 M	0,8 M

---

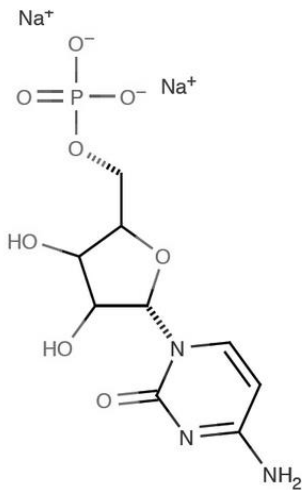
Natrium klorida memiliki kelebihan dibandingkan jenis garam yang lain dalam presipitasi DNA.

**Natrium klorida** (NaCl), dengan konsentrasi akhir 0,2 M, memiliki kelebihan dibandingkan jenis garam yang lain dalam presipitasi DNA. Selain mudah dan murah, keberadaan NaCl 0,2 M, dapat melarutkan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dalam etanol 70%. Oleh karena itu, penggunaan natrium klorida dianjurkan jika konsentrasi SDS yang tinggi digunakan untuk melisis sel. Namun, NaCl memiliki kelemahan karena kelarutannya yang terbatas dalam etanol 70%, sehingga sulit untuk menghilangkan garam secara sempurna dari sampel DNA. Hal ini terutama terjadi ketika DNA diendapkan melalui sentrifugasi. Konsentrasi NaCl yang tinggi dalam sampel DNA dapat mengganggu aktivitas beragam enzim. Ketika NaCl digunakan, DNA harus digulung, bukan disentrifugasi. Hal ini menjadikan NaCl sangat berguna dalam preparasi DNA skala besar dan memiliki berat molekul tinggi.

Natrium asetat adalah garam standar yang sering digunakan dalam presipitasi DNA, karena mudah larut dalam etanol.

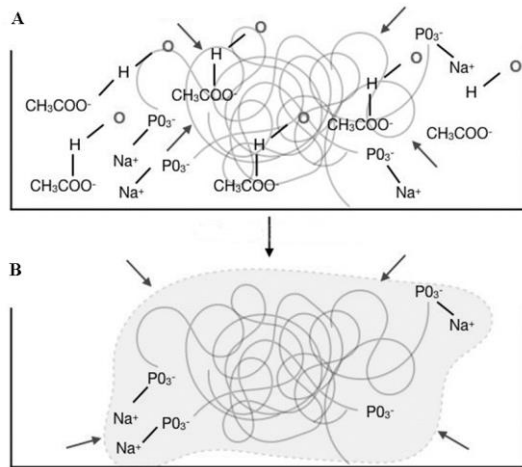
**Natrium asetat** (NaCH<sub>3</sub>COO, terkadang disebut NaOAc) adalah larutan garam standar yang sering digunakan dalam presipitasi DNA. Garam ini lebih larut dalam etanol daripada NaCl. Oleh karena itu, senyawa ini memiliki kemungkinan lebih kecil untuk mengendapkan sampel DNA. Sementara itu, kelarutan yang lebih tinggi dalam etanol 70% menjadikannya lebih mudah untuk dihilangkan dari preparat DNA dengan pencucian etanol 70% secara berulang. Dalam hal ini, konsentrasi (yaitu, konsentrasi akhir) larutan DNA sebelum penambahan alkohol harus 0,3 M. Untuk mencapai hal ini, maka peneliti harus menggunakan larutan natrium asetat 3 M pada pH 4,8 hingga 5,2. Gambar 1.15 memperlihatkan netralisasi DNA oleh ion Na<sup>+</sup>. Sementara itu, kompleksitas larutan DNA setelah penambahan Natrium asetat dan alkohol dapat dilihat pada Gambar 1.16.





**Gambar 1.15** Netralisasi DNA oleh ion  $\text{Na}^+$ .

Amonium asetat adalah garam yang sering pula digunakan dalam presipitasi DNA, karena mudah larut dalam etanol dan dihilangkan dari sampel DNA.



**Gambar 1.16** Kompleksitas larutan DNA setelah penambahan natrium asetat (A) dan alkohol (B).

**Amonium asetat** ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), dengan konsentrasi akhir 2,0 hingga 2,5 M, sangat larut dalam etanol dan mudah dihilangkan dari DNA. Hal ini terjadi karena volatilitas ion amonium dan asetat yang tinggi dalam larutan. Penggunaan amonium asetat, sebagai pengganti natrium asetat, juga dianjurkan untuk menghilangkan nukleotida trifosfat atau oligonukleotida untai tunggal atau ganda berukuran kecil (<30 bp), karena molekul-molekul ini cenderung tidak mengendap pada konsentrasi etanol tinggi. Selain itu, pengendapan DNA dengan amonium asetat telah terbukti lebih efisien untuk menghilangkan logam berat, deterjen, dan beberapa kontaminan yang tidak diketahui, serta merupakan penghambat potensial enzim restriksi endonuklease dan enzim lain yang digunakan untuk manipulasi DNA.

Kelemahan amonium asetat adalah harus disterilkan menggunakan teknik filtrasi, bukan autoklaf, karena volatilitas ion amonium dan

---

asetatnya yang tinggi. Sifat amonium asetat yang mudah menguap juga mengharuskan larutan stok segar dibuat setiap 1-2 bulan, disimpan dalam lemari pendingin dan wadah tertutup rapat. Disamping itu, senyawa ini tidak boleh digunakan jika DNA telah terfosforilasi, karena ion amonium akan menghambat T4 polinukleotida kinase, yaitu suatu enzim yang dapat menambah gugus fosfat pada ujung 5'-OH polinukleotida untuk melabel atau melangsungkan terjadinya ligasi.

**Litium klorida** (LiCl), yang digunakan dalam presipitasi DNA, dengan konsentrasi akhir 0,8 M, memiliki keunggulan karena kelarutannya yang tinggi dalam etanol. Penggunaannya menghasilkan preparat DNA yang relatif bebas garam. Kelemahannya adalah biaya LiCl yang relatif tinggi dibandingkan garam lain dalam presipitasi DNA. Konsentrasi LiCl yang tinggi juga digunakan untuk memisahkan mRNA dan rRNA dari DNA untai ganda dan RNA kecil tanpa kehadiran etanol. Pada LiCl 4 M, molekul RNA besar akan mengendap dari larutan dan terpisah dari DNA dan RNA bermolekul kecil

**Kalium klorida** (KCl) dan **kalium asetat** (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K) juga dapat digunakan dalam presipitasi DNA. Namun, KCl memiliki kelemahan karena dapat mengendap dalam jumlah besar dengan kehadiran isopropanol. Sementara itu, kalium asetat sering digunakan dalam preparasi DNA plasmid, terutama melalui bantuan lisis alkali, karena kalium membentuk endapan yang hampir tidak larut bersama dengan SDS.

<p><b>Catatan:</b> Ion klorida dari LiCl dapat menghambat inisiasi sintesis protein pada sebagian besar sistem bebas sel dan menghambat aktivitas polimerase DNA yang bergantung pada RNA. Oleh karena itu, senyawa ini tidak direkomendasikan dalam isolasi RNA untuk tujuan <i>reverse transcriptase</i>.</p>
---

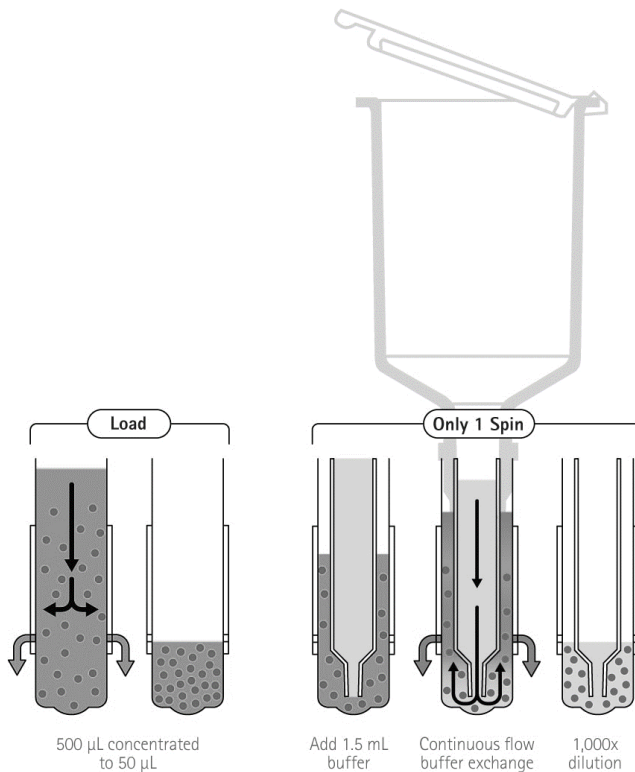
---

#### 1.5.4.2 Pemekatan DNA melalui dialisis

Dialisis dapat diaplikasikan untuk memekatkan DNA, sekaligus menghilangkan kontaminan berukuran kecil, seperti sisa garam dan fenol.

DNA dapat dipekatkan, sekaligus menghilangkan molekul yang memiliki berat molekul kecil melalui **dialisis**, seperti garam dan sisa-sisa fenol. Metode ini dapat digunakan jika isolasi DNA yang diinginkan memiliki berat molekul sangat tinggi ( $\geq 200$  kb).

Pengendapan DNA menggunakan alkohol dapat menyebabkan pemotongan senyawa tersebut. Oleh karena itu, relatif sulit untuk mendapatkan DNA dengan ukuran lebih besar dari 150 kb menggunakan metode ini. Dialisis dilakukan dalam tabung dialisis yang telah diberi perlakuan sebelumnya, menggunakan sejumlah bufer atau air (faktor pengenceran  $\geq 1000$  kali) dalam jangka waktu minimal 24 jam, atau tergantung volume larutan DNA. Selama dialisis, bufer harus diaduk. Sementara itu, jika volume DNA yang digunakan lebih besar, maka bufer harus diganti setiap beberapa jam. Untuk memekatkan sampel DNA, tabung dialisis harus dikelilingi serbuk kering senyawa penyerap air, seperti polietilen glikol (PEG) atau Aquacide II. Senyawa terakhir, yang dijual oleh Calbiochem Co., (cat. # 17851) adalah senyawa yang lebih baik untuk digunakan, tidak sebagaimana PEG, karena tidak mengandung jejak alkohol yang dapat terakumulasi dalam tabung dialisis. Gambar 1.17 memperlihatkan contoh skematik dialisis DNA menggunakan filter komersial.



**Gambar 1.17** Contoh skematik dialisis DNA menggunakan filter komersial (<https://www.merckmillipore.com>).

Kelemahan metode ini memerlukan waktu yang sangat lama, sehingga tidak cocok untuk volume sampel yang lebih kecil, karena sejumlah besar material hilang di dalam tabung. Untuk volume yang lebih kecil dapat digunakan metode mikrodialisis dengan menempatkan membran filter berdiameter pori 0,025 µm.

**Catatan:** Penting diperhatikan untuk memindahkan larutan DNA ke dan dari dalam tabung dialisis menggunakan pipet berukuran besar. Gunakan sarung tangan selama semua langkah prosedur dialisis untuk menghindari kontaminasi nuklease.

---

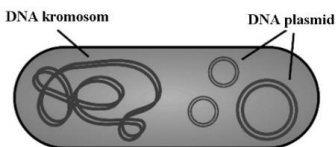
### 1.5.5 Pemurnian DNA satu langkah (*single-step*)

Pemurnian DNA satu langkah (*single-step*) sangat berguna untuk mengisolasi DNA dari sampel dalam jumlah terbatas atau besar. Prosedur ini umumnya merupakan modifikasi dari prosedur Chomczynski & Sacchi (1987). Chomczynski (1993) memperkenalkan prosedur yang memungkinkan isolasi RNA, DNA, dan protein satu langkah secara simultan dari sel dan jaringan hewan. Metode ini menggunakan TRI-Reagent™ (Macromolekuler Resource Center, Inc.) larutan monofasik dari fenol dan guanidin isotiosianat di mana sampel dihomogenkan. Fase air dipisahkan dari fase organik dengan penambahan kloroform. DNA tetap berada dalam fase air dan dapat diperoleh kembali dengan pengendapan etanol. Modifikasi metode ini telah dipublikasikan dan dapat meningkatkan jumlah DNA yang diisolasi.

Baru-baru ini, reagen pemurnian DNA satu langkah, yaitu DNAzol®, juga telah diperkenalkan oleh Molecular Research Center Inc. Reagen ini mengandung guanidin tiosianat dan campuran deterjen yang menyebabkan lisis sel dan hidrolisis RNA yang memungkinkan pengendapan selektif DNA dari lisat sel.

### 1.5.6 Pemurnian DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dari sel bakteri merupakan langkah penting dalam prosedur biologi molekuler.



**Gambar 1.18** Ilustrasi skematik DNA plasmid dan kromosom dalam sel bakteri.

Isolasi DNA plasmid dari sel bakteri merupakan langkah penting dalam prosedur biologi molekuler. Berbagai protokol isolasi plasmid skala besar dan kecil (*minipreps*) telah dipublikasikan. Prosedur pemurnian plasmid, tidak seperti prosedur pemurnian DNA genom, harus melibatkan penghilangan protein dan kontaminan utama lainnya, yaitu DNA kromosom bakteri. Dengan demikian,

---

kegiatan pemurnian plasmid secara substansial berbeda dengan preparasi DNA genom. Sebagian besar metode pemurnian DNA plasmid diawali dengan preparasi lisat kasar bakteri dan diakhiri dengan prosedur penghilangan protein standar, seperti telah dijelaskan sebelumnya. Untuk mencapai pemisahan plasmid dari DNA kromosom, metode ini memanfaatkan perbedaan struktural antara plasmid dan DNA kromosom. Plasmid adalah molekul DNA melingkar superkoil yang secara substansial lebih kecil dari DNA kromosom bakteri (lihat Gambar 1.18).

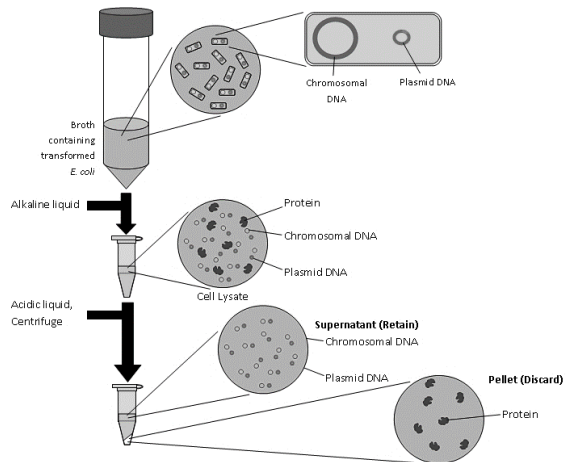
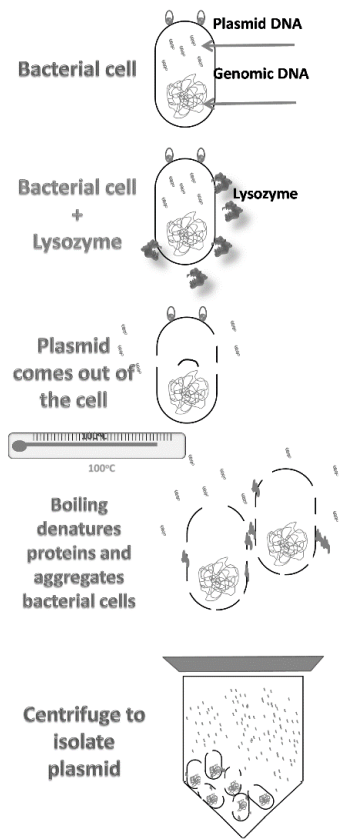
Terdapat tiga metode dasar preparasi plasmid, yaitu: **lisis basa**, diperkenalkan oleh Brinboim & Doly (1979), **lisis** dengan **perebusan** dan penambahan deterjen, diperkenalkan oleh Holmes & Quigley (1981), dan aplikasi **matriks afinitas**, diperkenalkan oleh Vogelstein & Gillespie (1979). Sejak diperkenalkan, berbagai modifikasi metode dasar telah dipublikasikan untuk meningkatkan hasil dan kemurnian DNA plasmid dan mengurangi waktu yang diperlukan untuk pemurniannya.

Isolasi DNA plasmid dari sel bakteri merupakan langkah penting dalam prosedur biologi molekuler.

Dalam metode **lisis basa**, sel dilisiskan dan DNA didenaturasi oleh SDS dan NaOH. Ilustrasi skematiknya dapat dilihat pada Gambar 1.19. Netralisasi larutan menghasilkan *re-annealing* DNA plasmid tertutup secara cepat dan kovalen akibat interkoneksi kedua lingkaran DNA untai tunggal. DNA kromosom bakteri yang jauh lebih kompleks tidak dapat di-*re-annealing* dalam waktu singkat dan DNA yang besar dan tidak larut. Sebagian besarnya karena reasosiasi antar untai DNA di berbagai tempat dan sepanjang membentuk jaringan molekul linier yang panjang. Pada tahap berikutnya, penurunan suhu akan menghasilkan pengendapan protein-SDS kompleks. Selanjutnya, kedua kompleks, DNA dan protein, dapat dihilangkan menggunakan sentrifugasi dan meninggalkan molekul plasmid di bagian supernatan.

Jika diinginkan plasmid yang lebih bersih, maka protein dan RNA yang tersisa harus dihilangkan menggunakan metode standar.

Dalam metode **perebusan**, suhu tinggi dan deterjen dapat melisiskan sel bakteri. DNA kromosom bakteri dalam kondisi ini, tetap melekat pada membran bakteri. Pada sentrifugasi berikutnya, pelet DNA-kromosom kompleks akan terpisah. Sementara itu, DNA plasmid akan tetap berada di dalam supernatan (Gambar 1.20). Modifikasi terbaru prosedur ini melibatkan lisis sel bakteri menggunakan microwave oven, bukan rebusan air mendidih.



**Gambar 1.19** Ilustrasi skematik lisis basa dalam preparasi DNA plasmid.

**Gambar 1.20** Ilustrasi skematik preparasi DNA plasmid menggunakan metode perebusan.

---

### 1.5.7 Penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA

Tahap terakhir prosedur isolasi DNA adalah penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA.

Tahap terakhir prosedur isolasi DNA adalah penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA. Tahap ini dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri dan *fluorescent dye*. Penentuan konsentrasi dan

kemurnian DNA akan dibahas lebih lanjut pada Bab 3.

### 1.5.8 Penyimpanan DNA

Sampel DNA harus disimpan dalam kondisi yang didalamnya sampel tersebut tidak terdegradasi.

Sampel DNA harus disimpan dalam kondisi yang didalamnya sampel tersebut tidak terdegradasi. Bahkan untuk kondisi penyimpanan yang ideal, seseorang diharapkan hanya terdapat satu pemutusan ikatan fosfodiester per 200 kb per tahun. Untuk penyimpanan jangka panjang dan meminimalkan deamidasi, pH bufer harus di atas 8,5, dan mengandung setidaknya 0,15 M NaCl dan 10 mM EDTA. Kotak 1.5 menyajikan beberapa faktor yang menyebabkan DNA mudah terdegradasi.

**Kotak 1.5** Kondisi berikut dapat meningkatkan laju degradasi DNA selama penyimpanan.

- **Kontaminasi DNase.**

Sumber kontaminasi utama yang menyebabkan hal ini adalah kulit manusia. Terlepas dari stabilitasnya yang rendah, sebagian besar DNase akan mendegradasi sampel DNA secara nyata. Untuk menghindari kontaminasi ini, baik secara langsung maupun tidak langsung, maka jari tangan harus menggunakan sarung tangan. Sementara itu, tabung dan larutan yang akan digunakan harus disterilkan terlebih dahulu. Karena DNA mudah diserap oleh permukaan kaca, maka hanya tabung plastik steril yang dapat digunakan untuk penyimpanan.



---

### **Kotak 1.5 Lanjutan...**

- **Kehadiran logam berat.**

Senyawa ini dapat memicu pemutusan ikatan fosfodiester sampel DNA. Bufer penyimpanan DNA untuk jangka panjang harus mengandung 10 mM atau lebih EDTA, suatu khelator logam berat. Jika terdapat EDTA, maka DNA dapat disimpan sebagai endapan dalam etanol 70%. Kondisi penyimpanan ini lebih disukai jika sampel disimpan pada suhu 5 °C karena dapat mencegah kontaminasi bakteri. Untuk penyimpanan DNA jangka pendek, konsentrasi EDTA 1 - 2 mM hingga 2 mM telah mencukupi.

- **Kehadiran ethidium bromide (EtBr).**

Kehadiran etidium bromida menyebabkan fotooksidasi DNA dengan cahaya tampak dan kehadiran molekul oksigen. Karena sulit untuk menghilangkan semua EtBr dari sampel DNA, maka sampel tersebut harus selalu disimpan di tempat gelap.

- **Suhu.**

Suhu terbaik untuk penyimpanan DNA jangka pendek yang memiliki berat molekul tinggi adalah antara 4 °C dan 6 °C. Pada suhu ini, sampel DNA dapat diambil dan dikembalikan ke penyimpanan tanpa siklus pembekuan dan pencairan yang menyebabkan kerusakan DNA. Untuk waktu penyimpanan yang sangat lama, 5 tahun atau lebih, maka DNA harus disimpan pada suhu  $\geq -70$  °C, dengan catatan tidak mengalami siklus beku-cair. Untuk menghindari siklus ini, maka DNA harus diencerkan menjadi volume kecil pada tabung terpisah yang memungkinkan penarikan sampel tanpa mengulangi pembekuan dan pencairan larutan stok. Penyimpanan DNA jangka panjang atau pendek yang memiliki berat molekul tinggi pada suhu -20 °C tidak dianjurkan, karena dapat menyebabkan kerusakan untai tunggal dan ganda yang nyata. Pada suhu ini, molekul air terikat tidak beku.

---

## 1.6 Latihan Soal

**Jawablah soal-soal berikut dengan benar!**

- Isolasi dan purifikasi DNA sangat penting untuk analisis biologi molekuler, seperti:
  - Analisis sidik jari DNA
  - Pembacaan sekuen DNA
  - Perpustakaan genom
  - Elektroforesis
  - I, II dan III benar
  - I dan III benar
  - II dan IV benar
  - IV saja yang benar
  - Benar semua
- Secara *in vivo*, DNA terdapat di dalam organel:
  - Mitokondria
  - Kloroplas
  - Nukleus
  - Lisosom
  - I, II dan III benar
  - I dan III benar
  - II dan IV benar
  - IV saja yang benar
  - Benar semua
- Berikut adalah termasuk kontaminan utama DNA:
  - RNA
  - Nukleotida
  - Protein
  - Lipid
  - I, II dan III benar
  - I dan III benar
  - II dan IV benar
  - IV saja yang benar
  - Benar semua
- Untai DNA dapat terputus saat preparasi (isolasi dan pemurnian), terutama akibat:
  - Homogenisasi secara kuat menggunakan vorteks
  - Kontaminasi RNase dan DNase
  - Kontaminasi protein dan lipid
  - Aktivitas enzim restriksi

- 
5. Dalam isolasi DNA, Tris lazim digunakan karena murah dan memiliki kapasitas penyangga yang sangat baik.
- Benar
  - Salah
6. Seluruh bufer yang digunakan dalam isolasi DNA harus mengandung inhibitor DNase. Dua jenis inhibitor DNase yang umum digunakan adalah .... dan .....
- EDTA dan detergen
  - CTAB dan EDTA
  - Tris dan detergen
  - CTAB dan EDTA
7. Deterjen yang lazim digunakan dalam pemurnian DNA adalah ....
- |               |           |
|---------------|-----------|
| I. SDS        | II. LDS   |
| III. Sarkosil | IV. CTAB. |
- I, II, dan III
  - I dan III
  - II dan IV
  - Semua benar
8. Cetyldimethylethyl ammonium bromide (CDA) adalah deterjen kationik yang lazim digunakan sebagai antiseptik topis, dan merupakan substitusi yang sangat baik untuk CTAB.
- Benar
  - Salah
9. Isolasi DNA, secara berurutan, meliputi empat tahap utama, yaitu:
- Destruksi atau pemecahan sel).
  - Pemisahan dan pemekatan DNA.
  - Penghilangan protein dan RNA.
  - Penentuan kemurnian dan kuantitas DNA.
- I > II > III > IV
  - I > III > II > IV
  - I > IV > II > III
  - II > III > IV > I

---

---

# 2

## Isolasi dan Purifikasi RNA

### 2.1 Capaian Pembelajaran

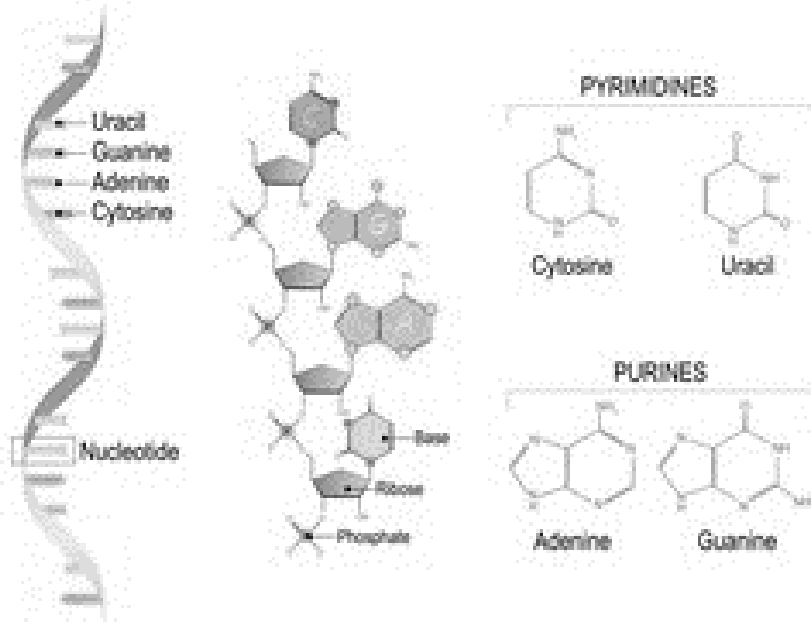
1. Mahasiswa mengetahui dan memahami komponen-komponen untuk isolasi RNA
2. Mahasiswa mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi isolasi RNA
3. Mahasiswa mampu mengetahui dan memahami solusi untuk menangani permasalahan dalam isolasi RNA

### 2.2 Pendahuluan

Isolasi RNA, juga merupakan langkah penting dalam analisis molekuler, terutama untuk analisis pola dan mekanisme ekspresi gen.

Asam ribonukleat atau lazim disebut RNA merupakan salah satu materi genetik yang sangat penting bagi organisme. Secara molekuler, senyawa ini merupakan hasil transkripsi DNA yang memiliki struktur berbeda dengan molekul tersebut (Gambar 2.1). Dalam metabolisme, RNA akan diterjemahkan menjadi beragam protein. Oleh karena itu, mendapatkan RNA murni merupakan langkah penting dalam analisis molekuler, terutama mempelajari pola dan mekanisme ekspresi gen. Disamping itu, isolasi RNA murni dan utuh adalah salah satu teknik utama dalam biologi molekuler dan merupakan langkah penting dalam analisis Northern, uji

perlindungan nuklease, pemetaan RNA, RT-PCR, konstruksi perpustakaan eDNA, dan analisis translasi secara *in vitro*.



**Gambar 2.1** Struktur molekul RNA.

Dua strategi isolasi RNA yang umum digunakan adalah isolasi RNA total dan mRNA.

Dua strategi isolasi RNA yang umum digunakan adalah isolasi RNA total dan mRNA. Suatu sel eukaryotik yang khas mengandung sekitar 10 hingga 20 pg RNA, sebagian besarnya terlokalisasi di sitoplasma. Sementara itu, sel prokaryotik mengandung 0,02 hingga 0,05 pg RNA. Sekitar 80 hingga 85 persen RNA eukaryotik adalah RNA ribosom, sedangkan 15 hingga 20 persen terdiri atas berbagai senyawa yang memiliki berat molekul rendah yang stabil, seperti RNA transfer dan RNA nuklear berukuran kecil. Secara umum, sekitar 1 - 3% RNA seluler adalah *messenger* RNA (mRNA) yang memiliki ukuran dan komposisi basa heterogen. Hampir semua mRNA eukaryotik bersifat 'monosistronik' dan mengandung sekuen poli A (Adenin) yang ditambahkan setelah transkripsi pada

---

ujung 3'-nya. Keberadaan poli-A 3' ini memungkinkan pemisahan dan isolasi mRNA dari semua kelas RNA lain yang terdapat di dalam sel.

Pada prokaryota, berbagai mRNA bersifat polisistronik dan tidak mengandung ujung poli A. Hal ini menambah sulitnya pemurnian mRNA dari sel prokaryotik. Oleh karena itu, bab ini khusus menjelaskan metode yang digunakan untuk isolasi RNA total dan mRNA pada eukaryotik.

### 2.3 Isolasi dan Purifikasi RNA Total

Isolasi RNA total lebih efisien dalam hal pengerjaan dibandingkan isolasi mRNA.

Isolasi RNA total paling sering digunakan dalam penelitian molekuler. Hal ini karena teknik ini tidak terlalu melelahkan dan memerlukan waktu lebih sedikit dalam pengerjaannya daripada isolasi mRNA.

Berbagai teknik isolasi dan pemurnian RNA total yang saat ini digunakan dan penerapannya tergantung pada sifat RNA yang diperlukan. Misalnya, jika RNA akan digunakan untuk RT-PCR secara kuantitatif, maka keutuhan RNA murni tidak diperlukan (tidak penting). Sementara itu, RNA utuh diperlukan untuk preparasi perpustakaan eDNA atau analisis Northern blot. Penghilangan kontaminasi DNA secara menyeluruh sangat penting jika RNA akan digunakan dalam analisis RT-PCR, tetapi tidak penting dalam analisis translasi secara *in vitro*. Teknik yang dijelaskan berikut menghasilkan RNA utuh murni yang baik untuk aplikasi apa pun.

Sifat fisik dan kimia RNA dan DNA sangat mirip, oleh karena itu, prosedur dasar pemurniannya hampir sama.

Sifat fisik dan kimia RNA dan DNA sangat mirip (Tabel 2.1), oleh karena itu, prosedur dasar yang digunakan dalam pemurniannya hampir sama, sebagaimana telah dijelaskan dalam Bab 1.

**Tabel 2.1** Perbandingan komposisi DNA dan RNA.

Karakteristik	DNA	RNA
Fungsi	Menyimpan informasi genetik	Terlibat dalam sintesis protein dan regulasi gen; pembawa informasi genetik pada beberapa virus
Gugus gula	Deoksiribosa	Ribosa
Struktur molekul	<i>Double helix/ double stranded</i>	Umumnya <i>single-helix/single-stranded</i>
Komposisi basa	C, T, A, G	C, U, A, G

Secara umum, metode isolasi dan pemurnian RNA menggabungkan langkah-langkah berikut:

- perusakan (disrupsi) sel atau jaringan,
- denaturasi kompleks nukleoprotein dan penghilangan protein secara efektif,
- pemekatan molekul RNA, dan
- penentuan kemurnian dan integritas RNA yang diisolasi.

Selain itu, metode isolasi RNA harus mencakup prosedur penghilangan DNA yang dimurnikan secara bersama saat preparasi. Berbeda dengan pemurnian DNA, menjaga kerusakan/pemotongan fisik untai RNA tidak diperlukan karena molekul tersebut jauh lebih kecil dan fleksibel daripada DNA. Oleh karena itu, dalam protokol isolasi RNA, kekuatan fisik yang kuat selama perusakan sel dan jaringan sering digunakan dan penggunaan pipet berukuran besar tidak diperlukan. Namun, isolasi RNA jauh lebih sulit daripada pemurnian DNA dalam skala besar, karena sensitivitas RNA yang tinggi terhadap degradasi ribonuklease internal dan eksternal. Enzim-enzim ini terdapat di mana-mana dan merupakan molekul yang sangat stabil dan tidak memerlukan kofaktor apa pun dalam aktivasinya. Dengan kata lain, aspek penting prosedur pemurnian RNA adalah inaktivasi RNase



---

endogen yang cepat dan ireversibel, serta perlindungan terhadap kontaminasi dengan RNase eksogen selama prosedur isolasi. Untuk tujuan tersebut, maka seluruh bufer ekstraksi termasuk inhibitor kuat RNase, larutan dan peralatan yang digunakan harus disterilisasi untuk menghilangkan RNase eksogen.

## 2.4 Penghilangan RNase

Inhibitor yang paling umum digunakan untuk menghambat RNase endogen dan tercakup dalam bufer ekstraksi adalah:

- Agen pendenaturasi protein yang kuat, seperti **guanidinium hidroklorida** dan **guanidinium isotiosianat** dapat digunakan pula untuk menonaktifkan RNase endogen dan mendenaturasi nukleoprotein kompleks. Konsentrasi akhir yang digunakan untuk tujuan ini adalah 4 M. Untuk mengubah sifat RNase secara ireversibel, kedua senyawa ini dapat dikombinasikan penggunaannya dengan 2-merkaptotanol konsentrasi tinggi.
- **Kompleks vanadil-ribonukleosida.** Kompleks vanadil-ribonukleosida adalah inhibitor yang ampuh untuk berbagai enzim ribonuklease. Kompleks ini relevan dengan metode fraksinasi sel serta sentrifugasi sukrosa-gradien. Ion oksovanadium IV akan membentuk kompleks dengan ribonukleosida dan mengikat sebagian besar RNase, sekaligus menghambat aktivitasnya. Kompleks vanadil-ribonukleosida harus ditambahkan ke dalam bufer ekstraksi hingga konsentrasi akhir 10 mM. Bufer tersebut tidak boleh mengandung EDTA, karena senyawa ini akan benar-benar memisahkan kompleks tersebut. Kompleks dapat digunakan secara bersama dengan agen deproteinisasi (fenol atau CIA) dan agen kaotrofik. Namun, senyawa ini mahal dan sulit dihilangkan dari RNA murni. Oleh karena itu, setiap residu yang berasal dari senyawa ini akan menghambat enzim-enzim yang digunakan dalam manipulasi RNA berikutnya.

- 
- **Asam aurintrikarboksilat (ATA).** Senyawa ini berikatan secara selektif dengan RNase dan mampu menghambat aktivitasnya. ATA umumnya dimasukkan ke dalam bufer ekstraksi yang digunakan untuk preparasi RNA bakteri. Inhibitor dapat mempengaruhi enzim tertentu dan tidak boleh digunakan jika RNA diperlukan untuk ekstensi primer atau analisis nuklease SI.
  - **Macaloid.** Merupakan tanah liat alami (natrium magnesium lithofluorosilikat) bermuatan negatif, sangat menyerap semua RNase. Macaloid dan RNase yang terikat dapat dikeluarkan selama preparasi melalui sentrifugasi.
  - **Penghambat protein RNase seperti RNasin.** Protein ini yang awalnya diisolasi dari plasenta manusia, namun mampu menghambat RNase melalui pengikatan non-kompetitif. Inhibitor ini tidak dapat digunakan dalam bufer ekstraksi yang mengandung denaturan kuat. Umumnya disertakan dalam larutan yang digunakan pada tahap pemurnian selanjutnya atau dalam bufer yang digunakan dalam penyimpanan atau manipulasi RNA berikutnya. Kehadirannya sangat penting dalam pengujian transkripsi dan translasi secara *in vitro* dan selama sintesis cDNA.

Sumber kontaminasi RNase eksogen yang paling umum adalah tangan dan bakteri, serta jamur yang terdapat pada partikel debu di udara. Untuk menghilangkan kontaminasi RNase eksogen, inhibitor yang paling sering digunakan adalah:

- **Diethyl pirokarbonat (DEPC).** DEPC menyebabkan inaktivasi enzim dengan mendenaturasi protein. Inaktivasi RNase bersifat ireversibel. Senyawa ini digunakan untuk menghilangkan RNase dari larutan dan peralatan gelas yang digunakan dalam preparasi RNA. DEPC harus digunakan dengan hati-hati karena sangat mudah terbakar dan diduga karsinogen kuat.
- **Larutan RNaseZap® atau RnaseOff.** Reagen ini tersedia secara komersial dan dapat menghancurkan RNase secara kontak dengan

---

sangat efektif. Larutan dekontaminasi ini tidak beracun dan dapat digunakan untuk menghilangkan RNase dari seluruh permukaan dan peralatan yang digunakan. Komposisi reagen ini adalah rahasia dagang.

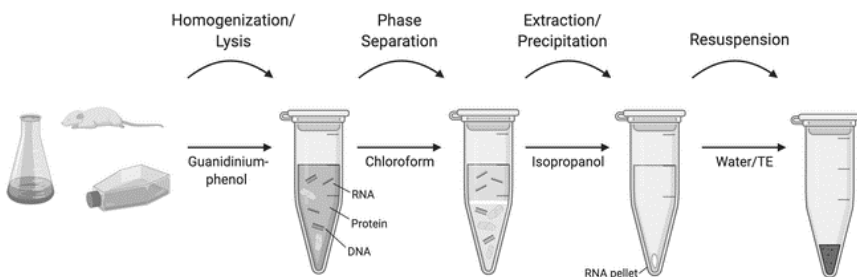
Kotak 2.1 memuat prosedur untuk mencegah kontaminasi peralatan dan larutan oleh RNase.

## 2.5 Metode Isolasi RNA Total

Berikut ini adalah penjelasan singkat mengenai beberapa metode isolasi RNA total yang banyak digunakan, meliputi:

### 2.5.1 Metode guanidinium fenol-panas

Metode guanidinium fenol-panas adalah modifikasi metode Chirgwin *et al.* (1979) dan Chomczynski & Sacchi (1987). Prosedur ekstraksi ini merupakan metode satu langkah yang memanfaatkan karakteristik RNA, dalam kondisi asam, untuk tetap berada dalam fase berair yang mengandung guanidin tiosianat 4 M (Gambar 2.2). Sementara itu, DNA dan protein akan didistribusikan ke dalam fase organik fenol: kloroform. Distribusi DNA ke dalam fase organik sangat efisien jika molekul tersebut berukuran kecil. Oleh karena itu, metode ini menggunakan prosedur untuk memecah DNA menjadi molekul berukuran tidak lebih besar dari 10 kb.



**Gambar 2.2** Contoh preparasi RNA total menggunakan metode guanidinium-fenol panas.

---

**Kotak 2.1** Prosedur untuk mencegah kontaminasi peralatan dan larutan oleh RNase:

- Sarung tangan harus selalu dipakai dan sering diganti, karena mudah terkontaminasi RNase.
- Tabung/tube yang akan digunakan harus senantiasa tertutup.
- Jika memungkinkan, gunakan peralatan plastik sekali pakai dan bersertifikat bebas RNase.
- Pipet tips dan tabung microfuge bebas RNase harus disterilkan. Tabung dan ujung microfuge biasa secara umum tidak mudah terkontaminasi RNase, sehingga tidak memerlukan perawatan khusus jika digunakan dari kantong yang belum dibuka. Saat memasukkannya ke dalam autoklaf, perlu berhati-hati agar tidak mengontaminasinya saat memuat ke dalam wadah. Gunakan sarung tangan saat melakukannya.
- Semua peralatan kaca harus diperlakukan menggunakan larutan DEPC 0,1% dan diautoklaf untuk menghilangkan DEPC. Dimungkinkan juga untuk menonaktifkan RNase dengan memanaskan (mengoven) peralatan gelas pada suhu 180°C selama minimal 2 jam sampai 24 jam. RNase dapat dengan mudah dan efisien dihilangkan dari peralatan kaca, meja, pipettor, dan permukaan plastik menggunakan solusi RNaseZap®. Kami sangat merekomendasikan penggunaannya.
- Semua larutan harus dibuat dengan air yang mengandung DEPC atau MilliQ yang disterilkan.

Sarkosil berkonsentrasi tinggi dan larutan yang dipertahankan pHnya pada < 5,5 dapat mengurangi degradasi RNA.

Untuk mengurangi degradasi RNA, dapat digunakan sarkosil konsentrasi tinggi dengan mempertahankan larutan pada pH 5,5 atau lebih rendah. Metode ini dapat digunakan untuk mengisolasi RNA total dari berbagai sel prokaryotik dan eukaryotik, seperti

bakteri, ragi dan *Chlamydomonas*, termasuk sel hewan, tumbuhan atau

---

jaringan sangat kaya RNase, misalnya sel pankreas atau daun tua. Disamping itu, metode ini memiliki efisiensi sangat tinggi (80-90%) untuk menghasilkan RNA berkualitas tinggi.

### 2.5.2 Metode garam litium klorida kadar tinggi

Metode garam litium klorida kadar tinggi dapat digunakan untuk mengisolasi RNA total dari beberapa jaringan tanaman.

Metode garam litium klorida kadar tinggi dapat digunakan untuk mengisolasi RNA total dari beberapa jaringan tanaman, terutama yang mengandung berbagai metabolit sekunder, seperti antosianin, fenolik, polisakarida dan lateks. Hal ini menunjukkan bahwa sangat sulit untuk mengisolasi RNA murni dari tanaman menggunakan agen kaotropik. Prosedur ini melibatkan kerusakan sel pada pH rendah, bufer garam tinggi dengan adanya inhibitor RNase. Protein dan DNA dihilangkan dengan fenol asam: ekstraksi CIA dan RNA dipulihkan dengan pengendapan lithium klorida.

### 2.5.3 Sentrifugasi gradien densitas

Aplikasi sentrifugasi gradien densitas (kepadatan) didasarkan atas perbedaan kepadatan DNA, RNA, dan protein dalam suatu larutan.

Perbedaan kepadatan DNA, RNA, dan protein (Tabel 2.2) menjadi dasar mengapa metode ini dilakukan. Dalam isolasi RNA, maka DNA dan protein harus dihilangkan. Melalui metode ini, partisi atau pemisahan ketiga molekul tersebut dapat dilakukan.

Secara konsep, sentrifugasi isopiknik, sejenis sentrifugasi gradien kerapatan, adalah teknik yang didalamnya makromolekul bergerak melalui gradien kerapatan sampai mereka menemukan kerapatan yang sama dengannya. Oleh karena itu, makromolekul akan terakumulasi pada posisi tersebut dalam gradien, kemudian terapung sampai akhir putaran sentrifugasi. Dalam beberapa kasus, RNA memiliki kerapatan

---

yang lebih besar daripada posisi mana pun dalam gradien dan terakumulasi sebagai pelet di bagian bawah tabung, sedangkan gradien dengan kerapatan maksimum yang lebih besar memungkinkan pengikatan RNA, sebanyak DNA plasmid diikat untuk pemurnian.

**Table 2.2** Karakteristik rentang densitas DNA, RNA dan protein.

Molekul	Densitas (g/ml)
Protein	1,2-1,5
DNA	1,5-1,7
RNA	1.7-2.0

Ket. Perubahan densitas apung sangat bergantung pada kandungan GC, metilasi dan modifikasi kimia lainnya, dan konfigurasi molekul, misalnya, lingkaran tertutup versus untai ganda, linier versus lingkaran tertutup.

Gradien klasik untuk jenis pemisahan ini adalah CsCl, CsTFA, dan cesium sulfat (Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Bahan lain seperti gliserol, ficoll, metrizamide, dan sukrosa juga memiliki aplikasi khusus; mereka tersedia dengan biaya rendah dan kemurnian tinggi. Resolusi asam nukleat berdasarkan perbedaan densitas paling baik dilakukan menggunakan salah satu garam cesium.

#### **2.5.4 Metode komersial 'TRI-Reagent™'**

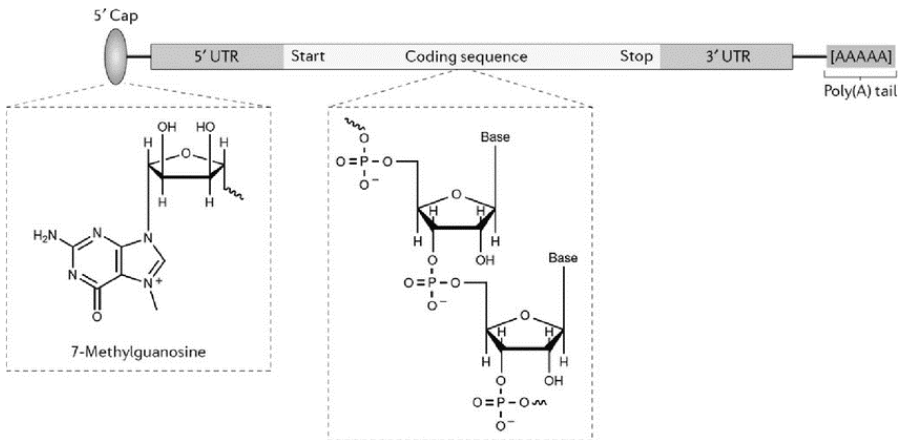
Metode TRI-Reagent™ adalah metode isolasi RNA satu langkah (*one-step*) menggunakan larutan fenol monofase (fase tunggal) dan guanidine isothiocyanate (TRI-Reagent™) yang dikombinasikan dengan pengendapan RNA oleh isopropanol dengan adanya garam tinggi. Metode ini sangat berguna untuk isolasi RNA secara cepat dari sejumlah sampel berukuran kecil dan dapat digunakan untuk semua jenis sel dan jaringan.

## 2.6 Isolasi mRNA atau Poly(A)<sup>+</sup>

Isolasi dan pemurnian mRNA sangat penting untuk memahami ekspresi gen.

Isolasi dan pemurnian mRNA sangat penting untuk memahami ekspresi gen. Secara umum, sekitar 1 hingga 3% RNA seluler hadir sebagai mRNA, sisanya adalah RNA ribosom

dan berbagai jenis RNA kecil yang stabil. Gambar 2.3 memperlihatkan struktur skematik mRNA. Sementara itu, Tabel 2.3 menyajikan beberapa tipe RNA berikut fungsinya. Untuk beberapa aplikasi, seperti konstruksi perpustakaan eDNA atau analisis mRNA dengan kelimpahan rendah, isolasi mRNA sangat penting daripada isolasi RNA total.



**Gambar 2.3** Struktur skematik mRNA.

Sebagian besar mRNA eukaryotik mengandung sekuen poli(A) pada ujung 3'nya, sedangkan sekuen ini tidak terdapat pada RNA seluler lainnya. Panjang sekuen ini relatif seragam untuk semua jenis mRNA, sekitar 200 hingga 250 nukleotida pada eukaryotik tingkat tinggi, dan sekitar 50 hingga 100 pasang nukleotida pada eukaryotik tingkat rendah (misalnya, ragi atau ganggang hijau).

**Tabel 2.3** Tipe RNA dan fungsinya.

<b>Tipe RNA</b>	<b>Nama</b>	<b>Simbol</b>	<b>Fungsi Dasar</b>	<b>Prokaryotik</b>	<b>Eukaryotik</b>
<i>Coding</i>	<i>Messenger RNA</i>	mRNA	Cetakan (template) untuk sintesis protein	Ada	Ada
	<i>Heterogeneous nuclear RNA</i>	hnRNA	Prekursor mRNA besar yang tidak bergabung (pre-mRNA)	Tidak	Ada
<i>Long non-coding (lnc)</i>	<i>Ribosomal RNA</i>	rRNA	Membentuk lipatan scaffold subunit ribosom	Ada	Ada
	<i>Transfer RNA</i>	tRNA	Transport asam amino ke ribosom untuk mendukung translasi	Ada	Ada
	<i>Long intergenic noncoding RNA</i>	lincRNA	Produksi transkripsi region intergenik	Tidak	Ada
	XIST	Xist	lncRNA terpaud kelamin yang terlibat dalam inaktivasi kromosom X dan pembentukan badan Barr	Tidak	Ada
<i>Small noncoding (snc)</i>	<i>Small nuclear RNA</i>	snRNA	Memfasilitasi penggabungan ( <i>splicing</i> ) hnRNA kedalam mRNA matang, termasuk pemrosesan rRNA. Molekul ini hadir sebagai suatu kompleks RNA-protein, lebih dikenal sebagai snRNP atau snurp	Tidak	Ada
	<i>Small nucleolar RNA</i>	snoRNA	Pemrosesan transkrip rRNA yang belum matang di dalam nukleolus; beberapa molekul ini juga terlibat dalam <i>gene silencing</i>	Tidak	Ada



**Tabel 2.3** Lanjutan ...

<b>Tipe RNA</b>	<b>Nama</b>	<b>Simbol</b>	<b>Fungsi Dasar</b>	<b>Prokaryotik</b>	<b>Eukaryotik</b>
<i>Small noncoding (snc)</i>	<i>Small cytoplasmic RNA</i>	scRNA	Memfasilitasi transportasi dan sekresi protein, termasuk degradasi mRNA. Molekul ini terdapat sebagai kompleks RNA-protein, disebut sebagai scRNP atau scryp	Ada	Ada
	<i>microRNA</i>	miRNA	RNA antisense pendek yang berpartisipasi dalam pengaturan ekspresi gen dengan memblokir mRNA dan menghambat translasi	Tidak	Ada
<i>Catalytic RNA</i>	<i>Ribozyme</i>	-	Molekul yang berfungsi sebagai katalis RNA	Ada	Ada
	<i>Telomerase RNA</i>	-	Bagian RNA dari kompleks enzim/RNA yang memperbaiki kromosom telomer (TERC: komponen RNA telomerase)	Tidak	Ada

---

Karakteristik ini digunakan untuk memisahkan mRNA dari RNA nonpoliadenilasi yang tersisa di dalam sel. Dalam praktiknya, sekuen poli(A) mRNA akan dihibridisasi pada konsentrasi garam tinggi menjadi poli dT atau poli U oligonukleotida, kemudian digabungkan ke dalam matriks padat. Setelah pencucian secara ekstensif untuk menghilangkan RNA yang tidak terikat, mRNA yang tertahan dalam matriks akan dielusi dari fase padat.

Teknik ini pertama kali diperkenalkan oleh Aviv & Leder (1972) menggunakan oligo(dT) yang terikat pada selulosa untuk mengisolasi mRNA. Sejak saat itu, modifikasi untuk meningkatkan efisiensinya hanya sedikit dilakukan, terutama dalam hal penggunaan matriks yang berbeda untuk pengikatan oligo(dT). Matriks baru yang digunakan untuk tujuan tersebut adalah:

- **Manik-manik lateks** yang memiliki permukaan besar untuk mengikat oligo(dT). Material ini dapat meningkatkan kapasitas pengikatan RNA poli(A)+ dalam matriks.
- **Partikel magnetik** yang memungkinkan pengumpulan mRNA terikat dengan mudah tanpa sentrifugasi atau elusi kolom. Matriks baru ini memungkinkan untuk mengisolasi mRNA langsung dari lisat sel. Peningkatan lain dari prosedur awal adalah substitusi poli(U) atas oligo(dT) sebagai bahan pengikat. Penggunaan poli(U) memungkinkan penangkapan mRNA yang lebih efisien dengan residu poli(A) pendek karena stabilitas turunan DNA: RNA yang tinggi.

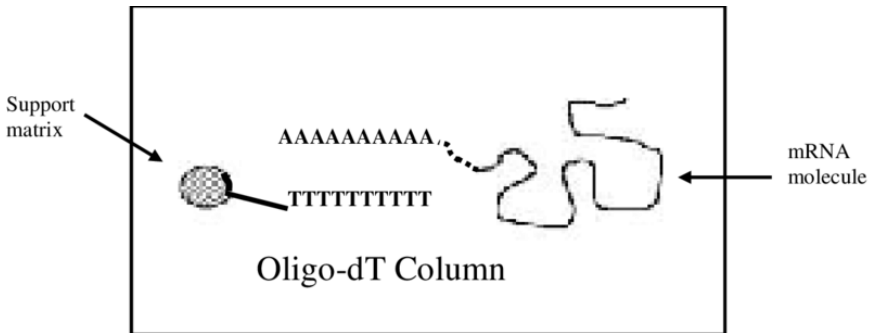
---

## 2.7 Metode isolasi mRNA

Penggunaan kolom oligo(dT)-selulosa yang dijalankan secara gravitasi sangat cocok untuk memurnikan mRNA dalam jumlah besar dari RNA total.

Berikut adalah tiga prosedur isolasi mRNA yang dapat dilakukan untuk menghasilkan materi tersebut dalam jumlah besar.

Prosedur pertama menggunakan **kolom** yang dikemas dengan selulosa oligo(dT) yang dijalankan secara gravitasi (Gambar 2.4). Metode ini cocok untuk memurnikan mRNA dalam jumlah besar dari RNA total. Keuntungan lain penggunaan prosedur ini adalah kualitas produk yang diperoleh tinggi dan biaya bahan yang digunakan rendah. Namun, terdapat pula kerugian yaitu menghabiskan banyak waktu, sehingga dapat meningkatkan kemungkinan kontaminasi RNase yang tidak disengaja dan degradasi produk. Metode ini harus digunakan dengan tidak kurang dari 1 sampai 5 mg total RNA sebagai bahan awal. Isolasi mRNA secara langsung dari lisat sel tidak memberikan hasil yang memuaskan menggunakan metode ini, sehingga hal ini tidak direkomendasikan.

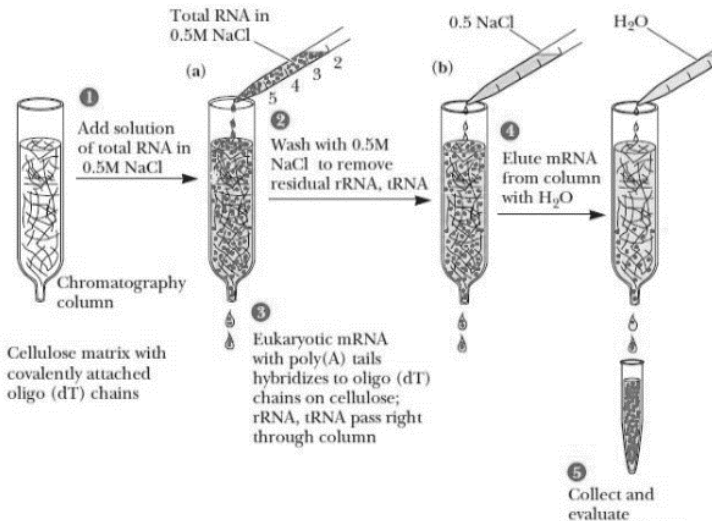


**Gambar 2.4** Kolom kromatografi afinitas Oligo-dT yang digunakan untuk isolasi Poli (A) + fraksi dari RNA total

Penggunaan kolom spin oligo(dT)-selulosa sangat ideal untuk pemurnian mRNA putaran kedua setelah isolasi mRNA menggunakan kolom gravitasi.

Metode kedua menggunakan **oligo(dT)-selulosa** yang dikemas dalam kolom spin (Gambar 2.5). Keuntungan metode ini adalah kecepatan dan kemudahannya, terutama bila menggunakan kolom

spin komersial. Metode ini dapat diaplikasikan hanya menggunakan sampel total RNA  $\leq 1$  mg sebagai bahan awal. Penggunaan kolom spin sangat ideal untuk pemurnian mRNA putaran kedua setelah isolasi mRNA menggunakan kolom gravitasi. Isolasi mRNA secara langsung dari sel lisat juga dimungkinkan, tetapi hasilnya kurang memuaskan jika lisat terlalu banyak. Kelemahan metode ini terletak pada kapasitas pemurniannya yang rendah, sehingga relatif sulit untuk menghilangkan rRNA dari sampel dan memerlukan biaya relatif lebih tinggi. Kalibrasi kecepatan dan perhatian yang cermat saat sentrifugasi harus mengikuti rekomendasi produsen supaya hasil yang dicapai optimal.

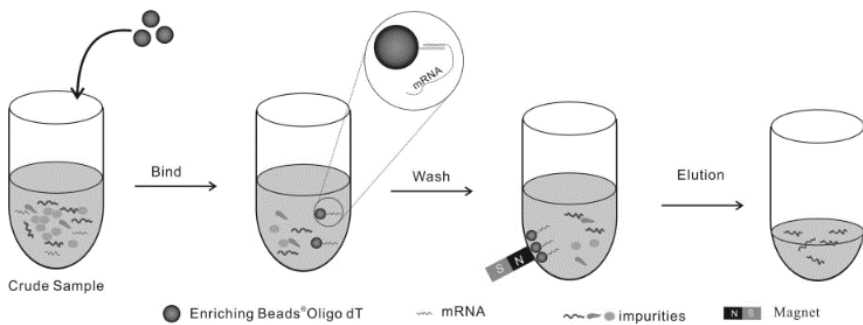


**Gambar 2.5** Contoh preparasi Poli (A) menggunakan oligo(dT)-selulosa yang dikemas dalam kolom spin.

Oligo(dT) yang terikat pada permukaan partikel magnetik dapat diaplikasikan untuk isolasi mRNA secara cepat langsung dari lisat beragam sampel sel.

Metode ketiga menggunakan **oligo(dT) yang terikat pada permukaan partikel magnetik** (Gambar 2.6). Metode ini berguna untuk isolasi mRNA secara cepat langsung dari lisat beragam sampel

sel. Prosedur ini dapat ditingkatkan dan digunakan untuk isolasi mRNA secara cepat dari RNA total. Produk yang dimurnikan sangat cocok untuk analisis Northern blot dan RT-PCR. Kelemahan utama metode ini memiliki biaya relatif tinggi, karena memerlukan pembelian pemisah magnetik.



**Gambar 2.6** Ilustrasi aplikasi oligo(dT) yang terikat pada permukaan partikel magnetik untuk isolasi mRNA.

**Catatan:** Aspek penting seluruh prosedur pemurnian mRNA, termasuk RNA yang lain, adalah perlindungan terhadap kontaminasi RNase eksogen. Oleh karena itu, untuk menjaga dari kontaminasi tersebut, semua tindakan pencegahan yang diperlukan dan metode penghilangan RNase dari reagen dan peralatan harus dilakukan. Selain itu, ketika bekerja dengan RNA konsentrasi rendah, pengikatan RNA yang tidak spesifik ke sisi kolom dan tabung bisa menjadi hal yang penting. Penggunaan tabung plastik dan tip selama seluruh prosedur sangat penting. Peralatan plastik silanisasi tidak diperlukan dan tidak direkomendasikan karena toksisitasnya yang tinggi.

---

## 2.8 Latihan Soal

**Jawablah pertanyaan berikut dengan benar!**

1. Jelaskan perbedaan antara RNA dan DNA!
2. Untuk mempelajari ekspresi gen, tipe senyawa RNA manakah yang sebaiknya Saudara gunakan:
  - a. mRNA
  - b. tRNA
  - c. rRNA
  - d. siRNA
3. Karena mRNA pada sel prokaryotik bersifat polisistronik dan tidak mengandung ujung poli A, maka pemurniannya relatif sulit dilakukan.
  - a. Benar
  - b. Salah
4. Berikut adalah metode (langkah-langkah) isolasi dan pemurnian RNA secara berurutan:
  - I. merusak (disrupsi) sel atau jaringan,
  - II. denaturasi kompleks nukleoprotein dan penghilangan protein secara efektif,
  - III. pemekatan molekul RNA,
  - IV. penentuan kemurnian dan integritas RNA.
  - a. I > II > III > IV
  - b. I > III > II > IV
  - c. I > II > IV > III
  - d. I > IV > III > II
5. Berikut adalah agen pendenaturasi protein yang kuat dalam isolasi RNA
  - I. Guanidinium hidroklorida
  - II. Vanadil-ribonukleosida
  - III. Guanidinium isotiosianat
  - IV. Asam aurintrikarboksilat

- 
- a. I, II dan III
  - b. I dan III
  - c. II dan IV
  - d. Hanya IV
6. Sebutkan fungsi dietil pirokarbonat (DEPC) dalam isolasi RNA!

---



---

# 3

## Kuantifikasi DNA/RNA

### 3.1 Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa mengetahui dan memahami konsep dasar kuantifikasi DNA/RNA
- Mahasiswa mengetahui dan memahami kuantifikasi DNA/RNA menggunakan metode spektrofotometri dan metode lain
- Mahasiswa mampu mengetahui dan memahami solusi untuk menangani permasalahan berkaitan dengan kuantifikasi DNA/RNA

### 3.2 Pendahuluan

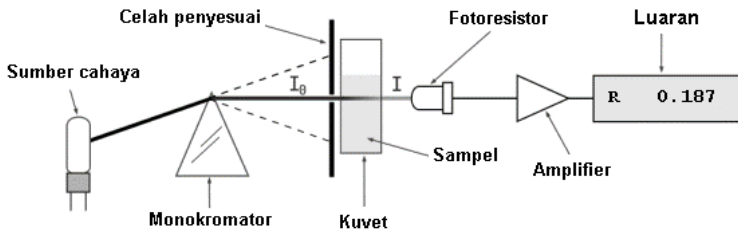
Spektrofotometri dan fluoresensi UV adalah dua metode umum yang digunakan dalam kuantifikasi asam nukleat (DNA/RNA).

Dalam biologi molekuler, kuantifikasi asam nukleat (DNA/RNA) umumnya dilakukan untuk menentukan konsentrasi rata-rata DNA atau RNA yang terdapat dalam campuran/larutan, serta kemurniannya. Beberapa analisis molekuler seringkali memerlukan jumlah dan kemurnian asam nukleat tertentu untuk menghasilkan kinerja optimal. Dalam bab ini, dibahas tentang dua metode untuk menetapkan konsentrasi asam nukleat, yaitu kuantifikasi **spektrofotometri UV** dan **pewarna fluoresensi**.

### 3.3 Analisis Spektrofotometri

Spektrofotometri ultraviolet (UV) paling sering digunakan untuk penentuan konsentrasi DNA/RNA.

Spektrofotometri ultraviolet (UV) paling sering digunakan untuk penentuan konsentrasi DNA/RNA. Struktur resonansi basa pirimidin dan purin bertanggung jawab atas penyerapan ini. Secara prinsip, asam nukleat dapat menyerap sinar ultraviolet dalam pola tertentu. Dalam spektrofotometer, sampel asam nukleat akan terkena sinar ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm. Sementara itu, foto-detektor yang terdapat pada spektrofotometer UV akan mengukur cahaya yang melewati sampel tersebut. Semakin banyak cahaya yang diserap oleh sampel, semakin tinggi konsentrasi asam nukleat dalam sampel. Dengan menggunakan **Hukum Lambert Beer** dimungkinkan untuk menghubungkan jumlah cahaya yang diserap dengan konsentrasi molekul penyerap. Gambar 3.1 memperlihatkan ilustrasi skematik analisis asam nukleat menggunakan spektrofotometer UV.



**Gambar 3.1** Diagram skematik analisis asam nukleat menggunakan spektrofotometer UV.

Sebagai contoh, DNA memiliki absorbansi maksimum dan minimum masing-masing pada 260 nm dan 234 nm. Namun, hal ini sangat dipengaruhi oleh tingkat ionisasi basa dan pH media pengukur. Hubungan antara absorbansi DNA pada 260 nm ( $A_{260}$ ) dengan Konsentrasi DNA ( $N$ ) dapat digambarkan melalui persamaan berikut:

---

$$A_{260} = \epsilon_{260} [N] \quad (3.1)$$

dengan demikian:

$$N = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260}} \quad (3.2)$$

dimana  $\epsilon_{260}$  adalah koefisien kehilangan DNA.

Koefisien untuk DNA untai ganda ini umumnya diambil sebagai  $0,02 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bila diukur pada pH netral atau sedikit basa. Jadi absorbansi 1,0 pada 260 nm memberikan konsentrasi DNA  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1/0,02 = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nilai koefisien absorpsi ( $A_{260}$ ) untuk DNA untai ganda relatif bervariasi tergantung persentase GC. Oleh karena itu, konsentrasi larutan DNA yang memiliki absorbansi 1 tidak selalu  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Namun, variasi kecil ini umumnya diabaikan. Koefisien kehilangan DNA untai tunggal adalah  $0,027 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$  memberikan konsentrasi ssDNA sebesar  $37 \mu\text{g}/\text{ml}$  untuk absorbansi 1 ( $1/0,027 = 37 \mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 3.3.1 Kemurnian sampel

Rasio absorbansi pada 260 dan 280nm ( $A_{260/280}$ ) digunakan untuk menilai kemurnian asam nukleat.

Asam nukleat dapat terkontaminasi beragam molekul (terutama protein) dan/atau senyawa (organik) lain. Rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm ( $A_{260/280}$ ) digunakan untuk menilai kemurnian asam nukleat. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang selain 260 nm digunakan untuk penentuan emurnian DNA. Spektrum yang relevan untuk tujuan ini terletak antara 320 nm dan 220 nm. Asam nukleat dapat terkontaminasi beragam molekul (terutama protein) dan/atau senyawa (organik) lain. Rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm ( $A_{260/280}$ ) digunakan untuk menilai kemurnian asam nukleat. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang selain 260 nm digunakan untuk penentuan pemurnian DNA. Spektrum yang relevan untuk tujuan ini terletak antara 320 nm dan 220 nm.

Seperti telah dibahas sebelumnya, setiap absorbansi pada panjang gelombang 320 nm menunjukkan kontaminasi senyawa tertentu. Protein menyerap secara maksimal pada panjang gelombang 280 nm karena adanya tirosin, fenilalanin dan triptofan. Dengan demikian, penyerapan pada panjang gelombang ini digunakan untuk mendeteksi protein dalam sampel DNA. Hal ini umumnya dilakukan dengan penentuan rasio  $A_{260}/A_{280}$ . Rasio untuk DNA untai ganda murni ini umumnya dilakukan antara 1,8 hingga 1,9.

Rasio  $A_{260}/A_{280}$  untuk DNA untai ganda murni adalah 2. Rasio antara 1,8 dan 1,9 sesuai dengan 60% dan 40% kontaminasi protein, secara berturut-turut. Selain itu, rasio  $A_{260}/A_{280}$  bukanlah indikator yang sangat sensitif atas kontaminasi protein karena koefisien kehilangan protein pada 280 nm adalah 10 sampai 16 kali lebih rendah daripada koefisien kehilangan DNA (lihat Tabel 3.1).

**Tabel 3.1.** Koefisien kehilangan DNA untai ganda dan protein.

Jenis Asam Nukleat	Koefisien kehilangan ( $10^{-3} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )		
	$\lambda$ 280	$\lambda$ 260	$\lambda$ 234
DNA	10,0	20,0	9,0-10,0
Protein	0,63-1,0	0,57	5,62

Oleh karena itu, seseorang tidak dapat menggunakan persamaan 3.1 untuk menghitung konsentrasi DNA secara tepat ketika protein terdapat dalam sampel. Hal ini karena persamaan tersebut hanya valid jika rasio  $A_{260}/A_{280}$  sama dengan 2. Namun, perhitungan ini mungkin dapat diukur pada rasio  $A_{260}/A_{280}$  dengan menggunakan persamaan berikut:

$$N = \frac{A_{260} - A_{280}}{\epsilon_{260} - \epsilon_{280}} \quad (3.3)$$

dimana: R adalah rasio koefisien kehilangan pada 280 nm hingga 260 nm untuk protein ( $p\epsilon_{280}/ p\epsilon_{260}$ ); N adalah konsentrasi DNA

---

dalam  $\mu\text{g}$ ;  $A_{260}$  dan  $A_{280}$  adalah absorbansi sampel DNA masing-masing pada 260 nm dan 280 nm dan,  $\epsilon_{260}$  dan  $\epsilon_{280}$  adalah koefisien absorpsi DNA pada 260 nm dan 280 nm, secara berturut-turut.

Dengan mengganti nilai koefisien penyerapan untuk DNA dan protein berdasarkan Tabel 3.1, maka persamaan menjadi:

$$N (\mu\text{g ml}^{-1}) = 70A_{260} - 40A_{280} \quad (3.4)$$

Indikator yang baik atas kontaminasi protein dalam sampel DNA adalah rasio  $A_{260}/A_{234}$ . Dalam hal ini, DNA memiliki absorbansi minimum pada panjang gelombang 234 nm, sedangkan protein pada absorbansi lebih tinggi, maximum 205 nm. Ketika rasio koefisien kehilangan DNA pada panjang gelombang 234 nm ( $\epsilon_{234}$ ) terhadap koefisien kehilangan protein terdapat pada panjang gelombang yang sama, yaitu antara 1.5 - 1.8 (lihat Table 3.1), maka rasio  $A_{260}/A_{234}$  merupakan indikator yang sangat sensitif untuk kontaminasi protein. Untuk asam nukleat murni, rasio ini berada antara 1.8 dan 2.0. Konsentrasi DNA dapat dihitung berdasarkan absorbansinya pada 260 nm dan 234 nm menggunakan persamaan berikut:

$$N = \frac{A_{260} - A_{234}/R}{\epsilon_{260} - \epsilon_{234}/R} \quad (3.5)$$

dimana R adalah rasio koefisien kehilangan protein pada 234 nm hingga 260 nm ( $p\epsilon_{234}/p\epsilon_{260}$ ); N adalah konsentrasi DNA dalam  $\mu\text{g/ml}$ :  $A_{260}$  dan  $A_{234}$  adalah absorbansi sampel DNA pada 260 nm dan 234 nm. Sedangkan  $\epsilon_{234}$  dan  $\epsilon_{260}$  adalah absorpsi koefisien DNA pada 234 nm dan 260 nm, secara berturut-turut.

Lebih lanjut, dengan mengganti nilai koefisien kehilangan atas DNA dan protein, berdasarkan Tabel 3.1, akan memberikan persamaan berikut:

$$N (\mu\text{g ml}^{-1}) = 52,6A_{260} - 5,24A_{234} \quad (3.6)$$

**Catatan:** Secara ringkas, pada panjang gelombang 260 nm, kehilangan rata-rata DNA untai ganda adalah  $0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , untuk DNA untai tunggal adalah  $0,027 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , untuk RNA untai tunggal adalah  $0,025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dan untuk oligonukleotida untai tunggal pendek tergantung pada panjang dan komposisi dasarnya. Dengan demikian, kerapatan optik (atau "OD") 1 setara dengan konsentrasi  $50 \mu\text{g/ml}$  untuk DNA untai ganda. Metode perhitungan ini berlaku hingga OD minimal 2. Koefisien kehilangan yang lebih akurat mungkin diperlukan untuk oligonukleotida; hal ini dapat diprediksi menggunakan model tetangga terdekat (*nearest-neighbor*).

### 3.3.2 Kontaminan lain

Kontaminan lain yang mungkin terdapat dalam sampel DNA adalah fenol, ion tiosianat, dan senyawa organik lain, serta partikel debu dan fluoresensi pewarna.

Berikut adalah kontaminan lain yang seringkali dijumpai dalam sampel DNA, diantaranya:

- **Fenol** yang lazim digunakan dalam pemurnian asam nukleat, seringkali menjadi kontaminan yang signifikan dalam kuantifikasi. Fenol menyerap cahaya pada panjang gelombang 270 nm dan  $A_{260/280}$  sebesar 1,2. Sampel asam nukleat yang tidak terkontaminasi fenol harus memiliki  $A_{260/280}$  sekitar 2.
- Absorbansi pada 230 nm dapat disebabkan oleh kontaminasi **ion fenolasi**, **tiosianat** dan **senyawa organik** lainnya. Untuk sampel RNA murni, Rasio  $A_{230:260:280}$  harus sekitar 1:2:1, dan untuk sampel DNA murni,  $A_{230:260:280}$  harus sekitar 1:1.8:1.
- Absorbansi pada 330 nm atau lebih tinggi menunjukkan kontaminan **partikel debu** pada larutan, menyebabkan hamburan cahaya dalam kisaran yang terlihat. Nilai sampel asam nukleat murni harus nol.
- Nilai negatif dihasilkan jika larutan yang salah digunakan sebagai blanko. Demikian pula, nilai-nilai ini dapat muncul karena **fluoresensi pewarna** dalam larutan.

---

### 3.4 Kuantifikasi Menggunakan Pewarna Fluoresen

Pewarna fluoresensi adalah metode alternatif untuk kuantifikasi asam nukleat (DNA/RNA).

Metode alternatif untuk mengukur konsentrasi DNA adalah menggunakan intensitas fluoresensi pewarna yang berikatan dengan asam nukleat dan secara selektif berpendar ketika diikat, misalnya oleh etidium bromida. Metode ini berguna untuk kasus-kasus yang berkaitan dengan konsentrasi DNA yang terlalu rendah untuk diukur menggunakan spektrofotometri. Di samping itu, metode ini juga bermanfaat dalam kasus yang didalamnya kontaminan dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 260 nm.

Terdapat dua cara utama dalam pendekatan ini. "spotting" melibatkan penempatan sampel langsung ke dalam gel agarosa atau bungkus plastik. Pewarna fluoresen yang terdapat dalam gel agarosa, atau ditambahkan dalam konsentrasi yang sesuai ke dalam sampel pada film plastik. Satu set sampel dengan konsentrasi yang telah diketahui kemudian ditotolkan dekat sampel. Konsentrasi sampel yang tidak diketahui kemudian diperkirakan dengan perbandingan dengan fluoresensi konsentrasi yang diketahui ini. Atau, seseorang dapat menjalankan sampel melalui agarosa atau gel poliakrilamida, di samping beberapa sampel konsentrasi yang diketahui. Seperti halnya spot test, konsentrasi diperkirakan melalui perbandingan intensitas fluoresen dengan sampel yang diketahui.

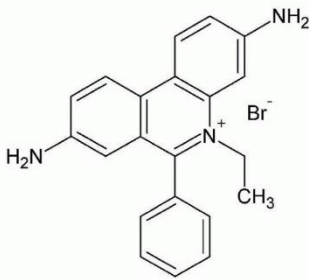
Jika volume sampel relatif besar untuk menggunakan *microplate* atau kuvet, sampel yang memuat warna juga dapat diukur menggunakan fotometer fluoresensi.

### 3.5 Jenis pewarna fluoresen

Lebih dari 50 pewarna DNA telah tersedia secara komersial. Berikut ini adalah pewarna DNA populer (mungkin terbaik) yang sering digunakan dalam penelitian:

(1) **Etidium bromida** (Gambar 3.2) adalah salah satu pewarna DNA paling populer. Hal ini karena EtBr menjadi senyawa pertama yang tersedia secara komersial. Pada awal tahun 1950-an, senyawa ini digunakan untuk mengobati penyakit pada ternak. Namun pada 1970-an, para ilmuwan mulai menggunakannya sebagai pewarna DNA. Dibandingkan pewarna DNA sejenis, EtBr relatif murah, bahkan dalam jumlah besar, harganya sangat terjangkau.

EtBr adalah pewarna DNA yang murah dan dapat diaplikasikan untuk elektroforesis gel dan mikroskop fluoresen, namun bersifat karsinogenik sehingga berbahaya bagi manusia.



**Gambar 3.2** Struktur etidium bromida.

Secara praktis, EtBr sangat baik untuk menandai/mewarnai DNA dalam elektroforesis gel agarosa, serta mendeteksi dsDNA dalam analisis PCR. Setelah mengikat DNA, EtBr akan mengalami peningkatan kecerahan sekitar 20 kali lipat dan dapat melepaskan fluoresensi berwarna oranye (605 nm) ketika tereksitasi oleh sinar UV (~ 300 nm). Namun, senyawa ini bukanlah probe yang baik untuk mendeteksi DNA dalam sel hidup, karena bersifat kedap air terhadap membran sel secara keseluruhan. Etidium bromida juga dapat mendeteksi RNA tergantung pada seberapa banyak pelipatan RNA terjadi.

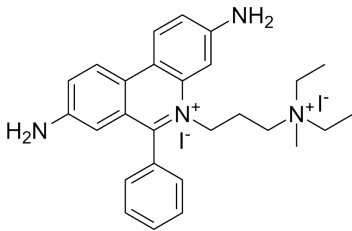
Selama bertahun-tahun, masalah kesehatan telah muncul atas penggunaan EtBr, diduga karena bersifat mutagenik. Meskipun sampai saat ini belum ada penelitian secara komprehensif untuk mendukung klaim ini, namun sebagai agen interkalasi, senyawa ini dapat mengganggu replikasi dan transkripsi DNA pada manusia ketika terpapar dalam jumlah besar. Pada konsentrasi rendah, senyawa ini tidak dianggap sebagai limbah berbahaya.



---

**(2) Propidium iodida** (Gambar 3.3) adalah pewarna DNA dan agen interkalasi. Senyawa ini termasuk dalam golongan kimia yang sama

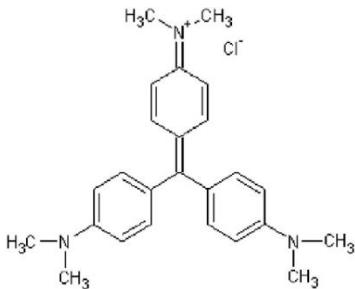
Propidium iodida adalah pewarna DNA dan dapat berinterkalasi dengan senyawa tersebut, mirip dengan etidium bromida.



**Gambar 3.3** Struktur propidium iodida.

dengan etidium bromida. Seperti EtBr, propidium iodida memiliki struktur cincin yang mengandung nitrogen yang membentuk intinya. Setelah mengikat DNA, senyawa ini akan mengalami peningkatan fluoresensi sebesar 20-30 kali lipat. Propidium iodida juga dapat mengikat RNA jika pelipatan terjadi. Propidium iodida adalah membran impermeabel, sehingga hanya dapat memasuki sel yang memiliki membran spesifik, sehingga sangat baik untuk mengidentifikasi sel-sel mati. Senyawa ini juga dapat digunakan untuk mengukur kandungan DNA secara kuantitatif dalam sampel biologis. Propidium iodida tidak memiliki preferensi sekuen tertentu dan mengikat kira-kira sekali per 4-5 pasangan basa. Persenyawaan ini dapat dideteksi menggunakan lampu xenon atau merkuri- serta laser argon-ion 488 nm. Karena emisinya pada 617 nm, maka senyawa ini dapat dengan mudah digunakan dalam uji multipleks. Disamping itu, propidium iodida dapat dikombinasikan dengan probe fluoresen hijau seperti fluorescein untuk *flow cytometry*, mikroskop fluoresensi dan spektroskopi fluoresensi.

**(3) Kristal violet** (Gambar 3.4) adalah senyawa kimia sederhana yang terdiri atas tiga cincin benzena terikat yang melekat pada tiga gugus amina. Senyawa ini telah lama digunakan untuk berbagai keperluan medis, terutama sebagai agen antibakteri dan



**Gambar 3.4** Struktur kristal violet.

antiseptik. Senyawa ini juga memiliki sejarah panjang dalam penggunaannya sebagai pewarna histologis dan pewarnaan Gram, untuk menentukan bakteri gram positif atau negatif. Sebagai pewarna DNA, kristal violet dapat digunakan untuk mendeteksi asam nukleat dalam elektroforesis gel. Dalam aplikasi ini, kristal violet berfungsi sebagai reagen alternatif pewarna fluoresen, seperti halnya etidium bromida.

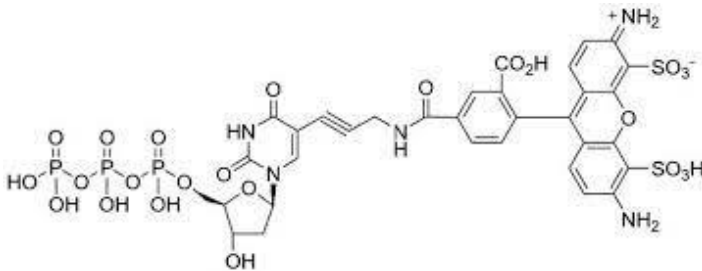
Namun, penggunaan kristal violet untuk tujuan ini dapat menyebabkan degradasi DNA. Adapun aplikasinya, terbukti kurang sensitif terhadap DNA daripada EtBr. Dalam hal ini, EtBr dapat mendeteksi paling sedikit 1 ng DNA dalam fragmen gel, sedangkan kristal violet hanya sekitar 16 ng. Sensitivitas ini dapat ditingkatkan menjadi 8 ng jika pewarna lain (seperti metil oranye) digunakan. Sebagai tambahan, kristal violet relatif tidak beracun/berbahaya dibandingkan EtBr.

**(4) Pewarna dUTP terkonjugasi** (Gambar 3.5) membentuk kelas detektor DNA yang menarik, terutama dihasilkan dari fleksibilitas

Kristal violet dapat digunakan untuk mendeteksi asam nukleat dalam elektroforesis gel, namun sensitivitasnya relatif lebih rendah dibandingkan EtBr.

Pewarna dUTP terkonjugasi dapat digunakan untuk memantau reaksi PCR, termasuk FISH (*fluorescence in situ hybridization*) dan ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

eksperimental yang mereka berikan. Ide dasar teknik ini adalah penempelan pewarna tersebut ke dalam dUTP, atau disebut 'linker'. Kemudian, dUTP akan dimasukkan ke dalam DNA melalui teknik molekuler. Dengan cara ini, maka DNA akan memiliki label pewarna. Karena dUTP dapat terkonjugasi dengan banyak probe yang berbeda, maka konjugat dUTP memiliki berbagai potensi aplikasi. Misalnya, probe dUTP dapat digunakan untuk memantau reaksi PCR, termasuk FISH (*fluorescence in situ hybridization*) dan ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

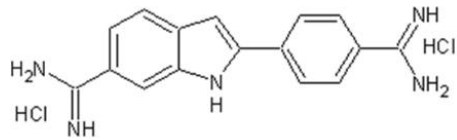


**Gambar 3.5** Struktur dUTP terkonjugasi.

Beberapa konjugat dUTP yang paling umum digunakan termasuk pelabelan dengan senyawa, seperti digoxigenin (DIG), biotin dan fluorescein. Pelabelan menggunakan senyawa ini seluruhnya bersifat non-radioaktif untuk deteksi DNA.

(5) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), seperti mayoritas pewarna DNA lain (Gambar 3.6), pertama kali disintesis sebagai agen medis. Senyawa ini awalnya digunakan dalam upaya pengobatan trypanosomiasis, yaitu penyakit yang disebabkan oleh parasit. Pada

DAPI dapat digunakan sebagai pewarna DNA karena dapat mengikat senyawa tersebut secara kuat, terutama region kaya basa A-T.



**Gambar 3.6** Struktur DAPI

akhir tahun 1970-an, DAPI telah digunakan sebagai probe DNA karena kelebihanannya dalam mengikat senyawa tersebut dan

---

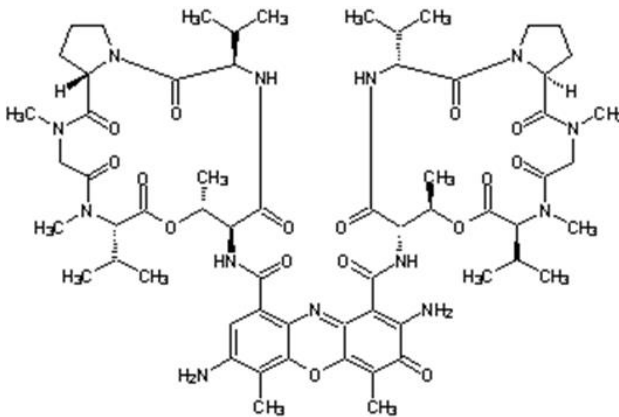
peningkatan fluoresensi berikutnya yang signifikan. DAPI dapat mengikat DNA untai ganda dengan sangat kuat, terutama region kaya basa A-T dan akan mengalami peningkatan fluoresensi sekitar 20 kali lipat saat pengikatan tersebut. Senyawa ini juga dapat mengikat RNA, namun peningkatan fluoresensinya relatif lemah.

Secara umum, DAPI dapat digunakan untuk mikroskop fluoresensi, serta memiliki eksitasi 358 nm dan emisi 461 nm. Senyawa ini juga dapat digunakan secara bersama dengan probe berpendar hijau seperti GFP. Dalam percobaan, DAPI memiliki sitotoksitas tinggi, oleh karena itu tidak digunakan dalam pewarnaan sel hidup. Beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa ini relatif tidak beracun bagi manusia jika terpapar. Namun, seperti probe DNA lainnya, DAPI mungkin berpotensi sebagai senyawa mutagenik.

(6) **7-AAD** atau **7-aminoactinomycin D** (Gambar 3.7) adalah pewarna fluoresen dan agen interkalasi yang memiliki afinitas kuat untuk mengikat DNA untai ganda. Namun tidak seperti DAPI yang mampu mengikat region kaya A-T,

7-AAD (7-aminoactinomycin D) adalah pewarna fluoresen dan agen interkalasi yang memiliki afinitas kuat untuk mengikat DNA untai ganda, terutama region kaya G-C.

senyawa 7-AAD secara selektif mampu mengikat region kaya G-C. Senyawa ini juga dapat mengikat RNA, sehingga enzim digesti mungkin diperlukan sebelum pewarnaan. Secara umum, 7-AAD memiliki eksitasi 546 nm dan emisi 647 nm, serta sangat berpendar oleh laser helium-neon 543 nm. Oleh karena itu, senyawa ini cocok untuk digunakan dalam mendeteksi populasi sel mati atau sel dengan membran yang sesuai. Disamping itu, 7-AAD dapat diaplikasikan untuk analisis mikroskop fluoresensi dan *flow cytometry*.

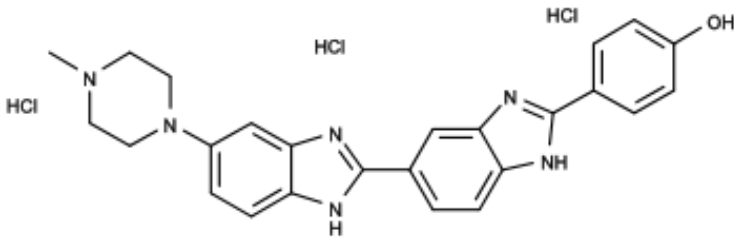


**Gambar 3.7** Struktur 7-AAD (7-aminoactinomycin D)

(7) Pewarna **Hoechst** (Gambar 3.8) adalah sekelompok pewarna DNA yang memendarkan warna biru. Senyawa ini telah digunakan untuk mewarnai DNA sejak tahun 1970-an dan dikembangkan oleh

Hoechst adalah sekelompok pewarna DNA yang memendarkan warna biru dan dapat mengikat DNA untai ganda, terutama region kaya A-T.

perusahaan Jerman Hoechst AG. Pewarna Hoechst menawarkan permeabilitas sel yang jauh lebih besar daripada pewarna analog seperti DAPI. Oleh karena itu, senyawa ini cocok untuk mewarnai sel hidup dan mati. Selain itu, karena sitotoksitas pewarna Hoechst relatif lebih rendah, maka dampaknya terhadap populasi sel hidup sangat kecil. Pewarna Hoechst secara selektif akan mengikat region kaya A-T dari DNA untai ganda. Setelah mengikat DNA, pewarna ini akan mengalami peningkatan fluoresensi hingga 30 kali lipat. Pewarna Hoechst dapat tereksitasi oleh sinar ultraviolet (~360 nm) dan memancarkan fluoresensi biru (~460 nm), serta kompatibel dengan lampu xenon-merkuri atau laser UV. Senyawa ini sangat baik untuk diaplikasikan dalam analisis mikroskop fluoresensi, imunohistokimia dan *flow cytometry*.

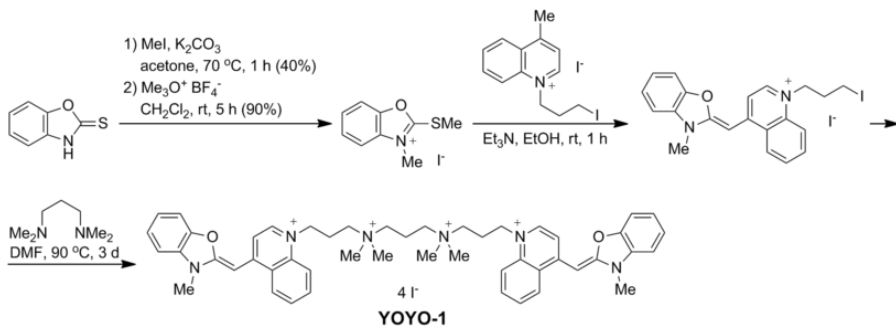


**Gambar 3.8** Struktur Hoechst 33258

(8) **YOYO-1/DiYO-1/TOTO-1/DiTO-1** (Gambar 3.9) adalah golongan pewarna cyanin yang berbasis di sekitar senyawa oksazol kuning. Terlepas dari namanya,

pewarna ini mampu memendarkan warna hijau, bukan kuning. Sebagai contoh, YOYO-1 (dan setara kimianya, DiYO-1) memiliki emisi maksimum pada panjang gelombang 509 nm. Hal yang sama berlaku untuk TOTO-1 (dan padanan kimianya, DiTO-1); senyawa ini memiliki emisi maksimum 535 nm. Senyawa ini adalah agen interkalasi yang mampu menyisipkan diri di antara permukaan planar pasangan basa DNA. Golongan pewarna DNA ini sangat terkenal karena afinitasnya yang tinggi terhadap DNA. Setelah mengikat DNA, pewarna ini dapat mengalami peningkatan fluoresensi seribu hingga tiga ribu kali lipat. Pewarna ini telah umum digunakan dalam uji viabilitas sel dan sitotoksisitas dalam hubungannya dengan platform seperti *flow cytometry*.

YOYO-1/DiYO-1/TOTO-1/DiTO-1 adalah golongan pewarna cyanin dapat mengikat DNA untai ganda dengan afinitas yang tinggi.



**Gambar 3.9** Struktur YOYO-1

(9) **Acridine Orange** adalah pewarna yang mampu membedakan antara DNA dan RNA tanpa manipulasi sebelumnya. Pasangan maksimum eksitasi/emisinya adalah 502 nm/525 nm dalam versi terikat DNA dan berubah menjadi 460 nm/650 nm dalam keadaan terikat RNA. Selanjutnya, dapat memasuki kompartemen asam seperti lisosom di mana pewarna kationik diprotonasi. Dalam lingkungan asam ini, acridine orange akan tereksitasi oleh cahaya spektrum biru, sedangkan emisi terkuat terdapat di wilayah oranye.

**Catatan:** Kombinasi beberapa pewarna dapat digunakan dalam percobaan. Namun eksitasi dan spektrum emisi masing-masing pewarna terkadang dapat tumpang tindih akibat *crossstalk* atau *bleedthrough*, sehingga dapat mengakibatkan munculnya nilai negatif atau positif palsu, atau data yang tidak jelas.

---

### 3.6 Latihan Soal

**Jawablah pertanyaan berikut dengan benar!**

1. Sebutkan dan jelaskan secara singkat tentang dua metode untuk kuantifikasi DNA/RNA!
2. Jelaskan mekanisme dasar pengukuran kualitas dan kuantitas asam nukleat menggunakan metode spektrofotometri?
3. Rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260/280}$ ) lazim digunakan untuk menilai kemurnian asam nukleat. Bagaimana kriterianya? Berikan penjelasan singkat!
4. Sebutkan dan jelaskan beberapa senyawa atau substansi yang menjadi kontaminan asam nukleat?
5. Sebutkan lima pewarna fluoresence yang dapat diaplikasikan dalam kuantifikasi asam nukleat?



## Amplifikasi DNA (PCR)

### 4.1 Capaian Pembelajaran

1. Mahasiswa mengetahui dan memahami konsep dasar amplifikasi DNA menggunakan metode PCR
2. Mahasiswa mengetahui berbagai komponen dan faktor yang terlibat dan mempengaruhi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR
3. Mahasiswa mampu mengetahui dan memahami solusi untuk menangani permasalahan dalam amplifikasi DNA menggunakan metode PCR

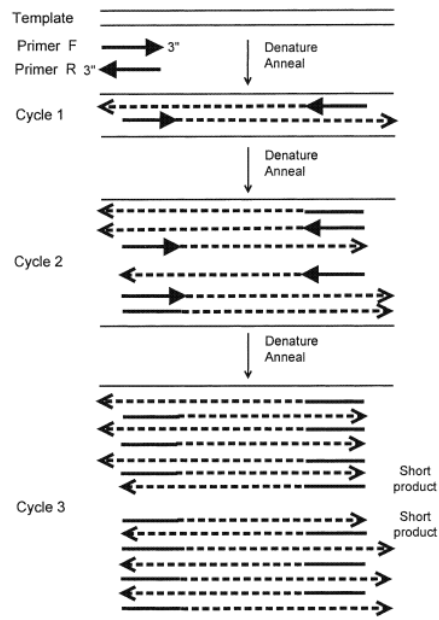
### 4.2 Pendahuluan

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode molekuler untuk mengamplifikasi (memperbanyak) DNA secara *in vitro*. Sebagian besar segmen DNA yang memiliki panjang dan urutan basa tertentu dapat disintesis dari sampel atau cetakan (*template*) DNA dalam jumlah kecil. PCR adalah metode yang cepat, sensitif dan murah untuk mengamplifikasi DNA yang dikehendaki (target). Metode ini telah merevolusi biologi molekuler dan digunakan dalam berbagai cabang ilmu alam dan kedokteran.

Secara prinsip, analisis PCR relatif sederhana dan melibatkan amplifikasi enzimatik dari fragmen DNA yang diapit oleh dua oligonukleotida (primer) yang dihibridisasi pada untai cetakan DNA yang berlawanan, terutama ujung 3' saling berhadapan

(Gambar 4.1). DNA polimerase dapat mensintesis DNA baru mulai ujung 3 pada setiap primer. Siklus denaturasi-panas yang berulang dari cetakan DNA, penyambungan primer dan pemanjangan primer oleh DNA polimerase menghasilkan amplifikasi fragmen DNA. Produk ekstensi dari masing-masing primer dapat berfungsi sebagai cetakan untuk primer lain yang pada dasarnya menghasilkan penggandaan jumlah fragmen DNA dalam setiap siklus. Hasilnya adalah peningkatan jumlah fragmen DNA spesifik secara eksponensial yang ditentukan oleh ujung 5' primer.

**Gambar 4.1.** Diagram skematik amplifikasi DNA yang dihasilkan dari reaksi berantai DNA polimerase.



Kary Mullis adalah orang pertama yang menemukan metode PCR.

Berdasarkan sejarah, metode PCR mulai dilakukan ketika Kary Mullis, seorang peneliti di Cetus Corporation, memikirkan teknik tersebut pada suatu Jumat malam di musim panas 1983. Pada musim dingin berikutnya, setelah membuat beberapa tebakan tentang konsentrasi dan waktu reaksi, dia melakukan eksperimen

---

pertamanya. Dia beruntung karena pertama kali dia mencoba reaksinya, ternyata berhasil! Prosedur awal menggunakan fragmen Klenow dari DNA polimerase I asal *E. coli* yang ditambahkan langsung dalam setiap siklus karena enzim dinonaktifkan pada setiap langkah denaturasi.

Pengenalan DNA polimerase termostabil dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*, disingkat *Taq* telah mendorong pengembangan instrumen PCR menggunakan siklus otomatis, yang secara substansial mampu mengurangi waktu pekerjaan PCR. Penggunaan DNA polimerase ini juga dapat meningkatkan spesifisitas dan hasil produk yang diinginkan karena suhu yang lebih tinggi untuk perlekatan (*annealing*) dan pemanjangan (ekstensi) dapat digunakan.

Sejak pertama kali diperkenalkan, berbagai modifikasi telah dilakukan pada metode PCR. Namun dalam bab ini akan dibahas mengenai konsep dasar PCR dan protokol pengerjaannya secara umum. Tujuannya adalah untuk memberikan pengenalan secara menyeluruh terhadap metode PCR yang dapat menjadi dasar untuk memahami aplikasi berikutnya yang lebih modern.

### 4.3 Kinetika Reaksi Amplifikasi (PCR)

Selama reaksi PCR, produk dari satu siklus berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis DNA pada siklus berikutnya.

Selama reaksi amplifikasi (PCR), produk dari satu siklus berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis DNA pada siklus berikutnya. Hal ini menyebabkan akumulasi produk secara eksponensial. Secara teoritis, jumlah produk akan berlipat ganda setiap siklus menjadikan proses PCR menjadi reaksi berantai sejati yang dijelaskan oleh persamaan berikut:

$$N = N_0 \times 2^n \quad (4.1)$$

dimana:  $N$  = jumlah molekul yang diamplifikasi,  $N_0$  = jumlah molekul awal, dan  $n$  = jumlah siklus amplifikasi.

---

Persamaan ini berlaku jika efisiensi amplifikasi (E), yang didefinisikan sebagai pemisahan molekul cetakan yang mengambil bagian dalam amplifikasi selama setiap siklus sama dengan 1 (satu). Persamaan yang lebih menggambarkan proses amplifikasi, dengan mempertimbangkan efisiensi proses adalah:

$$N = N_0 \times (1 + E)^n \quad (4.2)$$

dimana: E adalah efisiensi amplifikasi.

Dalam skala percobaan, akumulasi produk selama reaksi berlangsung melebihi kasus yang dijelaskan pada persamaan 2. Hal ini karena efisiensi amplifikasi bervariasi selama reaksi berlangsung. Pada awalnya, efisiensi amplifikasi mendekati 1 (0,8 hingga 0,97) dan akumulasi produk berlangsung secara eksponensial (fase reaksi eksponensial). Selama siklus akhir PCR, akumulasi produk akan terus melambat dan akhirnya berhenti. Efek ini disebut sebagai efek 'plateau' atau 'dataran tinggi'. Hal ini umumnya terjadi setelah produk amplifikasi terakumulasi 0,3 hingga 1,5 pmol. Namun, jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai 'plateau' tergantung pada jumlah awal molekul yang terdapat dalam reaksi ( $N_0$ ).

Tabel 4.1 menyajikan jumlah siklus untuk mengurangi jumlah DNA target awal, yang diperlukan untuk memberikan produk yang terlihat tanpa mencapai 'plateau'. Namun, pembentukan 'plateau' dapat dipengaruhi oleh sejumlah kondisi, misalnya pemanfaatan substrat, suhu siklus, stabilitas enzim dan reaktan, serta penghambatan polimerase oleh pirofosfat atau kontaminan lainnya. *Re-annealing* produk pada konsentrasi tinggi, pemisahan untai yang tidak sempurna pada konsentrasi produk yang tinggi, pembentukan primer-dimer, atau kandungan GC dari cetakan DNA yang diamplifikasi, juga dapat mempengaruhi pembentukan 'plateau'. Dengan demikian, kondisi yang disajikan pada Tabel 4.1 harus diperlakukan hanya sebagai pedoman umum untuk mengoptimalkan reaksi PCR.

Adapun Tabel 4.2 menyajikan jumlah cetakan DNA yang direkomendasikan dari organisme berbeda yang diperlukan untuk mengamplifikasi satu salinan fragmen DNA genom.

**Catatan:** Mencapai kurva puncak harus selalu dihindari karena dapat meningkatkan kemungkinan mendapatkan produk amplifikasi non-spesifik tanpa meningkatkan konsentrasi molekul yang diinginkan secara substansial. Oleh karena itu, menentukan jumlah siklus PCR yang benar adalah salah satu cara untuk menghindari produk inisiasi yang salah. Hal ini dapat dicapai dengan menentukan konsentrasi awal molekul DNA target dengan benar. Umumnya, protokol amplifikasi PCR standar adalah 30-35 siklus.

**Tabel 4.1** Hubungan antara jumlah awal molekul target ( $N_0$ ) dan rekomendasi jumlah siklus dalam reaksi PCR.

Jumlah awal molekul ( $N_0$ )	Jumlah siklus (n)	Jumlah molekul yang disintesis <sup>1</sup>	Jumlah produk (pmole)
$3,0 \times 10^5$	~ 25	$7,2 \times 10^{11}$	1,2
$1,5 \times 10^4$	~ 30	$7,2 \times 10^{11}$	1,2
$1,0 \times 10^3$	~ 35	$8,2 \times 10^{11}$	1,4
50,0	~ 45	$3,1 \times 10^{11}$	0,5

<sup>1</sup>hasil perhitungan menggunakan persamaan 2, pada efisiensi amplifikasi 0,8.

**Tabel 4.2** Rekomendasi jumlah cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi standar PCR.

Sumber DNA	Jumlah DNA /reaksi	Jumlah molekul/reaksi	Jumlah siklus
Plasmid	~ 1 pg – 10 pg	$3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$	25-30
Bakteria	~ 1 ng – 10 ng	$3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$	25-30
Eukaryotik tingkat rendah	~ 10 ng – 100 ng	$3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$	25-30
Hewan (manusia)	~ 100 ng – 1000 ng	$3 \times 10^4$ - $3 \times 10^5$	30-35
Tumbuhan (kacang-kacangan)	~ 100 ng – 1000 ng	$3 \times 10^4$ - $3 \times 10^5$	30-35

---

## 4.4 Komponen Standar Reaksi PCR

Komponen standar PCR, meliputi: DNA polimerase, DNA *template*, primer, dNTP, MgCl<sub>2</sub> dan garam.

Komponen reaksi PCR standar, meliputi: DNA polimerase termotabil, cetakan DNA (*template*), primer, substrat dNTP, bufer MgCl<sub>2</sub> dan garam. Selain itu, reaksi PCR

seringkali menyertakan senyawa yang dapat menstabilkan enzim dan reagen yang membantu disosiasi DNA atau *annealing* (perlekatan) primer.

### 4.4.1 DNA polimerase

DNA polimerase termotabil yang paling umum digunakan dalam PCR adalah *Taq* polimerase.

DNA polimerase termotabil yang paling umum digunakan dalam PCR adalah *Taq* polimerase. Oleh karena itu, sebagian besar protokol PCR standar dioptimalkan

menggunakan aktivitas maksimal enzim ini. Namun, *Taq* polimerase memiliki beberapa kelemahan yang menjadikannya kurang ideal untuk beberapa aplikasi. Pertama, enzim memiliki tingkat kesalahan yang sangat tinggi karena kurangnya aktivitas eksonuklease 3' sampai 5'. Hal ini dapat mengganggu preparasi DNA untuk *sequencing*, serta ketidakmampuannya untuk mendapatkan produk replikasi yang panjang. Kedua, enzim dapat menambahkan nukleotida ke ujung 3' dengan cara yang tidak bergantung pada DNA cetakan, sehingga produk amplifikasi sulit untuk dikloning. Ketiga, harga enzim relatif mahal.

Oleh karena itu, atas dasar/alasan inilah maka DNA polimerase termotabil dari bakteri termofilik atau hipertermofilik telah diisolasi, dikarakterisasi dan diperkenalkan secara komersial untuk reaksi PCR. Tabel 4.3 menyajikan daftar DNA polimerase ini dan karakteristik utamanya.

**Tabel 4.3** DNA polimerase termostabil yang tersedia secara komersial dan karakteristiknya.

Kondisi Reaksi				Aktivitas Eksonuklease		Laju kesalahan (kesalahan /bp x 10 <sup>-4</sup> )
Enzim	Mg <sup>++</sup> (mM)	pH	Temp. °C	5' - 3'	3' - 5'	
<i>Taq</i>	2,0 – 4,0	7,8 – 9,4	70 - 80	+	-	0,5 – 2,1
<i>Pfu</i>	1,5 – 8,0	8,9 – 9,0	70 - 80	+	+	0,06
<i>Pwo</i>	2,0	8,0 – 9,0	70 – 80	+	+	0,06
<i>Tli</i> (Vent)	2 <sup>1</sup>	8,8	72 - 75	+	+	2,0 – 5,0
<i>Tli</i> -exo (Vent-)	2 <sup>1</sup>	8,8	72 – 75	+	-	2,0
<i>Tth</i> <sup>2</sup>	1,5 – 2,5	8,0 – 9,3	50 – 60	+	-	n/a
<i>Taq</i> (Stoffel frg)	1,5 – 2,5	8,0 – 9,3	70 – 8-	-	-	0,5
Ampli-Therm™	1,5 – 2,5	8,3	70 - 95	-	-	n/a

<sup>1</sup> MgSO<sub>4</sub> harus digunakan sebagai pengganti MgCl<sub>2</sub>

<sup>2</sup> Enzim polimerase ini memiliki aktivitas reverse transcriptase dengan adanya ion Mn<sup>++</sup>

**Catatan:** Konsentrasi enzim dalam campuran reaksi dapat mempengaruhi akurasi/ketelitian produk. Jumlah DNA polimerase yang berlebihan dapat menyebabkan amplifikasi produk PCR nonspesifik. Jumlah enzim yang direkomendasikan untuk tiap reaksi PCR adalah 1 hingga 5 unit. Konsentrasi yang paling sering digunakan adalah 2,0 unit/100 µl reaksi. Namun, kualifikasi enzim dapat bervariasi berkaitan dengan cetakan DNA individu atau primer yang digunakan. Oleh karena itu, bijaksanalah dalam menggunakan konsentrasi enzim yang direkomendasikan oleh produsen karena aktivitas enzimnya dapat bervariasi.

---

#### 4.4.2 Cetakan (*template*) DNA

Sampel (cetakan/*template*) DNA adalah salah satu komponen terpenting dalam reaksi PCR.

Salah satu komponen terpenting dalam reaksi PCR adalah penggunaan sejumlah kecil sampel DNA, meskipun relatif tidak murni. Bahkan penggunaan DNA yang terdegradasi pun dapat berhasil diamplifikasi. Oleh karena itu, sejumlah protokol sederhana dan cepat untuk memurnikan DNA untuk PCR telah dikembangkan. Dalam buku ini beberapa metode telah dijelaskan tentang pemurnian DNA. Terlepas dari kenyataan bahwa DNA tidak harus benar-benar murni, namun sejumlah kontaminan dapat menurunkan efisiensi amplifikasi. Adanya urea, SDS, natrium asetat, dan beberapa komponen yang dilarutkan dari agarosa dapat mengganggu reaksi PCR. Namun, sebagian besar kontaminan dapat dihilangkan melalui pencucian dengan etanol 70% atau pengendapan kembali DNA menggunakan amonium asetat. Protokol untuk menghilangkan kontaminan ini telah dijelaskan dalam buku ini dalam bab tentang pemurnian DNA.

#### 4.4.3 Primer

Primer adalah sekuen nukleotida pendek berukuran sekitar 12-20 basa, sebagai titik pelekatan DNA polimerase dalam pemanjangan DNA target.

**Primer** adalah sekuen nukleotida pendek berukuran panjang sekitar 12-20 basa yang diperlukan sebagai titik pelekatan enzim DNA polimerase untuk pembentukan atau pemanjangan DNA suatu gen spesifik dalam reaksi PCR. Pedoman umum pemilihan primer untuk PCR dapat dilihat pada Kotak 4.1.

Secara umum, reaksi PCR memerlukan konsentrasi primer sekitar 0,2 sampai 1  $\mu\text{M}$ . Penggunaan terlalu banyak primer dapat mengakibatkan inisiasi yang salah dan pembentukan "primer-dimer". Jarak antara primer juga dapat sangat bervariasi. Namun,



---

efisiensi amplifikasi menurun jauh untuk jarak sekuen yang lebih besar dari 3 kbp.

Dalam beberapa kasus, fragmen DNA pendek dapat diamplifikasi dengan efisiensi yang lebih tinggi daripada DNA panjang. Amplifikasi fragmen DNA pendek disukai karena lebih efisien dalam hal pemanjangan biasanya secara lengkap oleh enzim dalam setiap siklusnya. Amplifikasi fragmen DNA berukuran besar mungkin dapat dilakukan dengan modifikasi kondisi reaksi standar menggunakan campuran DNA polimerase (misalnya, *Taq* dan *Pfu*). Kondisi PCR seperti ini dikenal dengan istilah *long PCR*. Beragam kit komersial telah tersedia untuk melakukan reaksi PCR semacam ini.

**Catatan:** Saat ini, beragam program komputer (*software*) secara komersial dapat merancang set primer. Beberapa program bagus yang dibagikan secara gratis adalah: PRIMER dari Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://www-genome.wi.edu>) untuk komputer (PC) berbasis Windows, serta Amplify dan HyperPCR untuk Macintosh (<ftp://iubio.bio.in.diana.edu>).

#### 4.4.4 Substrat

Konsentrasi dNTP dalam PCR tidak boleh melebihi 200 $\mu$ M.

Konsentrasi masing-masing dNTP dalam PCR tidak boleh melebihi 200 $\mu$ M. Jumlah substrat ini mencukupi untuk mensintesis 12,5  $\mu$ g DNA ketika setengah dari nukleotida digabungkan, jumlah yang jauh melebihi jumlah DNA yang disintesis dalam PCR standar (lihat Tabel 4.1). Keempat dNTP harus digunakan pada konsentrasi yang sama, terutama jika digunakan *Taq* polimerase. Hal ini dapat meminimalkan tingkat kesalahan enzim. Kelebihan nukleotida dapat menghambat aktivitas enzim dan berkontribusi terhadap munculnya produk lain (non-target). Selain itu, ketika konsentrasi dNTP divariasikan, harus diingat bahwa dNTPs dapat mengkelat

---

ion magnesium, sehingga konsentrasinya akan menurun dalam campuran reaksi.

**Kotak 4.1** Pedoman umum pemilihan primer untuk PCR

- Set primer yang optimal harus berhibridisasi (berlekatan) dengan DNA template secara spesifik, bukan dengan sampel lainnya. Untuk memastikan hal ini, maka primer harus memiliki panjang setidaknya 20 hingga 25 basa. Namun, pada beberapa aplikasi yang memerlukan inisiasi acak ganda (seperti analisis RAPD), primer umumnya memiliki panjang 8 hingga 10 basa.
- Jika memungkinkan, primer harus memiliki kandungan GC yang mirip dengan sekuen target. Kandungan GC sebesar 40% hingga 60% secara umum dapat bekerja baik pada sebagian besar reaksi PCR. Namun, kandungan GC antara primer *Forward* dan *Reverse* harus identik.
- Primer tidak boleh memiliki sekuen basa dengan struktur sekunder yang signifikan. Oleh karena itu, sekuen primer tidak boleh mengandung pengulangan sederhana atau palindrom.
- Pasangan primer tidak boleh mengandung sekuen komplementer satu sama lain. Khusus primer yang dapat tumpang tindih pada ujung 3' harus dihindari. Hal ini dapat mengurangi munculnya pembentukan "primer-dimer" yang sangat mempengaruhi efisiensi amplifikasi.

#### 4.4.5 Konsentrasi $MgCl_2$

Ion magnesium adalah kofaktor yang diperlukan untuk mengaktifkan DNA polimerase.

Ion magnesium adalah kofaktor yang diperlukan untuk mengaktifkan DNA polimerase. Selain itu, konsentrasi ion magnesium juga dapat mempengaruhi hal-hal berikut:

- 
- *Annealing* (penempelan) primer pada DNA *template*.
  - Suhu disosiasi untuk untai DNA *template* dan produk.
  - Spesifitas produk (target) yang dihasilkan.
  - Pembentukan artefak primer-dimer dan akurasi enzim.

Sebagian besar DNA *template* memerlukan optimalisasi konsentrasi ion magnesium untuk amplifikasi secara efisien dan tepat. Konsentrasi optimal  $Mg^{++}$  untuk setiap DNA polimerase termofilik dapat dilihat kembali dalam Tabel 4.3. Setiap DNA polimerase tersebut harus berfungsi sebagai titik awal untuk mengoptimalkan konsentrasi ion magnesium dalam reaksi PCR.

#### 4.4.6 Bufer dan garam

Bufer standar PCR adalah Tris-HCl 10-50 mM, pH 8-9.

Bufer standar untuk PCR adalah Tris-HCl konsentrasi 10 hingga 50 mM. pH optimum antara 8 dan 9 untuk sebagian besar DNA polimerase termofilik (Tabel 3.3). Karena  $L_1$  pKa untuk Tris tinggi ( $-0.031$  / $^{\circ}C$ ), pH sebenarnya dari campuran reaksi selama siklus termal tipikal sangat bervariasi (sekitar 1 hingga 1,5 unit pH).

Garam yang digunakan dalam sebagian besar reaksi adalah kalium atau natrium.  $K^+$  ( $Na^+$ ) umumnya ditambahkan untuk memfasilitasi penempelan primer dengan benar. Untuk *Taq* polimerase, konsentrasi yang lazim digunakan adalah 50 mM. Konsentrasi ion monovalen yang lebih tinggi dari itu dapat menghambat aktivitas polimerase. Ketika mengamplifikasi DNA menggunakan instrumen amplifikasi siklus cepat, tidak perlu menggunakan garam, karena akurasi penempelan primer dapat dicapai sebagai hasil dari waktu penempelan yang singkat. Beberapa komponen lain yang dapat digunakan dalam reaksi untuk membantu stabilisasi enzim adalah: gelatin, albumin serum sapi atau deterjen nonionik, seperti Tween 20 atau Triton X100.

---

Namun, sebagian besar protokol bekerja dengan baik tanpa penambahan bahan-bahan ini.

Saat menggunakan cetakan DNA dengan kandungan GC tinggi, maka campuran reaksi juga menyertakan reagen untuk menurunkan  $T_m$  cetakan DNA. Di antaranya adalah DMSO, asetamida atau gliserol. Penggabungan 5% asetamida ke dalam campuran reaksi dapat meningkatkan hasil dengan banyak cetakan kompleks tanpa mempengaruhi aktivitas *Taq* polimerase.

#### 4.4.7 Profil suhu panas (*Thermal cycle*)

PCR standar terdiri atas tiga tahap: denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Langkah-langkah ini dapat diulang 25 sampai 30 kali (siklus). Sebagian besar protokol juga menyertakan dua tahap tambahan, meliputi denaturasi awal (dilakukan sebelum siklus dimulai) dan ekstensi akhir (dilakukan pada akhir reaksi).

Denaturasi awal dilakukan selama beberapa menit untuk memastikan cetakan DNA terdenaturasi secara sempurna.

Denaturasi awal dilakukan selama beberapa menit untuk memastikan cetakan DNA terdenaturasi secara sempurna. Tahap awal ini penting untuk cetakan DNA yang kompleks atau memiliki kandungan GC tinggi.

Sementara itu, tahap ekstensi akhir umumnya dilakukan selama 5 sampai 10 menit untuk memastikan penyelesaian produk ekstensi parsial oleh DNA polimerase dan renaturasi produk untai tunggal secara lengkap.

##### 4.4.7.1 Tahap denaturasi

Denaturasi merupakan reaksi orde satu yang terjadi sangat cepat, umumnya pada suhu 94-95°C.

Pada tahap ini, pemisahan untai cetakan DNA harus dilakukan secara sempurna. Denaturasi merupakan reaksi orde satu yang terjadi sangat cepat. Waktu standar 0 hingga 60 detik

---

digunakan untuk memastikan pemanasan yang seragam dari seluruh volume reaksi. Suhu siklus denaturasi umumnya 94°C hingga 95°C.

#### 4.4.7.2 Tahap *annealing*

*Annealing* adalah reaksi orde satu semu yang terjadi sangat cepat, suhu tergantung pada kandungan GC primer.

Pada tahap ini, primer akan menempel pada cetakan DNA. Reaksi *annealing* adalah reaksi orde satu semu yang terjadi sangat cepat. Waktu umum (pada sebagian besar protokol) yang digunakan untuk tahap ini adalah 30 hingga 60 detik. Suhu *annealing* tergantung pada kandungan GC primer dan harus disesuaikan secara hati-hati. Suhu *annealing* rendah akan menghasilkan perlekatan dan inisiasi primer yang tidak spesifik. Sementara itu, suhu tinggi akan mencegah perlekatan primer dan akibatnya mencegah sintesis DNA. Pada sebagian besar primer, suhu *annealing* 50-55°C digunakan tanpa optimasi lebih lanjut.

#### 4.4.7.3 Tahap ekstensi atau elongasi

Ekstensi atau elongasi merupakan reaksi pemanjangan DNA target, suhu yang lazim digunakan adalah 7°C.

Pada tahap ini, DNA polimerase akan mensintesis untai DNA baru dengan memperpanjang ujung 3' primer. Waktu perpanjangan sangat bergantung pada panjang sekuen DNA target yang akan diamplifikasi. Karena *Taq* polimerase dapat menambahkan 60-100 basa per detik dalam kondisi optimal, maka sintesis fragmen DNA dengan ukuran 1 kb memerlukan waktu kurang dari 20 detik. Namun, sebagian besar protokol merekomendasikan 60 detik per 1 kb DNA untuk menghitung waktu yang diperlukan untuk mencapai suhu yang benar dan mengkompensasi faktor lain yang tidak diketahui yang dapat mempengaruhi laju reaksi. Waktu sesingkat mungkin harus

---

digunakan untuk mempertahankan aktivitas DNA polimerase. Dalam instrumen siklus cepat udara, waktu pemanjangan umumnya dihitung secara teoritis untuk laju pemanjangan polimerase, yaitu 15-20 detik per 1 kb fragmen yang diinginkan.

Suhu ekstensi 72°C lazim digunakan dalam protokol amplifikasi standar. Suhu ini mendekati suhu optimal untuk *Taq* polimerase (75°C), tetapi relatif rendah untuk mencegah disosiasi primer dari cetakan DNA. Namun, harus diingat bahwa *Taq* polimerase memiliki aktivitas pemanjangan yang substansial pada suhu yang digunakan pada sebagian besar langkah *annealing*, yaitu 55°C. Sintesis residu ini dapat menstabilkan interaksi primer dengan cetakan DNA. Di sisi lain, penggunaan suhu ekstensi lebih tinggi dari 72°C dapat dilakukan ketika cetakan DNA mampu membentuk struktur sekunder yang dapat proses tersebut.

#### 4.5 Peralatan PCR (Pemakaian Alat)

Siklus PCR harus dilakukan sesingkat mungkin untuk mengurangi waktu reaksi secara keseluruhan, mencegah inaktivasi enzim dan meningkatkan ketepatan reaksi.

Siklus PCR harus dilakukan sesingkat mungkin untuk mengurangi waktu reaksi secara keseluruhan, mencegah inaktivasi enzim dan meningkatkan ketepatan reaksi. Umumnya, alokasi waktu ini sangat bergantung pada karakteristik

kinerja instrumen yang digunakan, terutama perubahan pemanasan dan pendinginan sampel yang terjadi. Dalam instrumen terbaik, penggunaan sampel volume kecil dan tabung berdinding tipis dapat mengurangi waktu siklus PCR.

Sebagian besar peralatan PCR komersial menggunakan blok logam atau air untuk kesetimbangan suhu dan sampel yang terkandung dalam tabung microfuge plastik. Dalam peralatan ini, perubahan suhu secara cepat tidak mungkin dilakukan. Hal ini

---

karena sebagian besar siklus dihabiskan untuk pemanasan dan pendinginan blok dan tabung, serta cairan yang terkandung di dalamnya. Akibatnya, waktu pengerjaan menjadi relatif lebih lama.

Selain itu, waktu amplifikasi yang panjang dan transisi yang lama dapat mempersulit penentuan suhu dan waktu optimal untuk setiap tahap reaksi PCR. Hal ini menyebabkan kesalahan oleh DNA polimerase sehingga menghasilkan produk dengan spesifitas yang buruk. Oleh karena itu, transisi suhu yang cepat dan volume sampel yang kecil dapat meningkatkan spesifisitas dan waktu yang diperlukan untuk melakukan reaksi PCR. Kotak 4.2 menyajikan tiga pendekatan rekayasa untuk mengurangi siklus amplifikasi/PCR.

#### 4.6 Visualisasi Hasil PCR

Visualisasi produk hasil PCR dapat dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Produk PCR umumnya berukuran kecil, oleh karena itu perlu digunakan elektroforesis agarosa resolusi tinggi untuk menganalisisnya. Prosedur elektroforesis lebih lanjut dijelaskan dalam Bab 5. Disamping itu, beragam produk non spesifik atau artefak PCR seringkali terdeteksi dalam elektroforesis gel. Kotak 4.3 menyajikan beberapa masalah dan penyelesaian (*troubleshooting*) berkaitan dengan munculnya artefak PCR tersebut.

**Kotak 4.2. Tiga pendekatan rekayasa untuk mengurangi waktu siklus amplifikasi:**

- Penggunaan volume reaksi yang sangat kecil dalam tabung berdinding tipis yang dikembangkan secara khusus atau pelat 96 lubang tunggal. Solusi ini dapat meningkatkan biaya, namun tidak dapat mengatasi masalah transisi suhu karena inersia perpindahan panas dari blok logam atau air.
- Penggunaan beberapa blok stasioner, masing-masing dipertahankan pada suhu yang berbeda, bukan satu blok pemanas. Lengan mekanik memindahkan tabung dari satu blok ke blok lainnya. Pendekatan ini memecahkan masalah inersia panas tetapi mahal dan memerlukan penggunaan tabung berdinding tipis yang mahal.
- Penggunaan *thermal cykler* udara. Instrumen siklus termal cepat ini menggunakan perpindahan panas melalui udara panas ke sampel yang terdapat dalam tabung kapiler kaca tipis. Karena kapasitas panas udara yang rendah, maka dinding tipis dan luas permukaan pipa kapiler dapat meningkat, sementara sampel dapat diulang dengan sangat cepat. Total waktu amplifikasi pada instrumen ini, untuk 30 siklus PCR, adalah 15 hingga 20 menit. Selain itu, spesifisitas amplifikasi juga meningkat secara drastis. Peralatan berbiaya rendah dibandingkan peralatan PCR standar. Penggunaan

**Kotak 4.3. Permasalahan dan penyelesaian munculnya artefak PCR:**

- Kegagalan untuk mengamplifikasi produk atau amplifikasi yang sangat lemah untuk reaksi yang "berhasil" sebelumnya. Hal ini umumnya merupakan hasil dari kegagalan beberapa komponen reaksi. Namun, paling sering terjadi akibat degradasi primer. Untuk menghindari hal ini, encerkan primer baru dan ulangi PCR.



#### **Kotak 4.3. Lanjutan:**

- Menggunakan cetakan DNA dengan konsentrasi terlalu tinggi adalah penyebab utama kegagalan reaksi PCR. Untuk mengatasi hal ini, ukurlah konsentrasi DNA sampel, kemudian kerjakan reaksi PCR dengan menurunkan konsentrasi cetakan DNA tersebut.
- Selanjutnya periksa integritas cetakan DNA dan kebaruan substrat (dNTP). Kinerja dNTP akan memburuk dengan cepat setelah dibekukan dan dicairkan beberapa kali. Encerkan cetakan DNA baru dan/atau larutan dNTP.
- Kegagalan untuk mengamplifikasi produk atau amplifikasi yang sangat lemah untuk reaksi amplifikasi 'baru'. Dalam hal ini, menjalankan reaksi kontrol positif dapat menentukan apakah ini masalah dengan komponen campuran reaksi atau dalam parameter PCR yang benar. Jika yang terakhir adalah kasusnya, maka mungkin hal ini disebabkan oleh primer yang salah, suhu *annealing* yang salah untuk primer yang dipilih, atau konsentrasi magnesium yang salah. Denaturasi cetakan DNA yang tidak memadai atau adanya inhibitor dalam sampel DNA juga dapat menyebabkan kegagalan reaksi PCR. Solusinya, lakukan optimasi kondisi reaksi PCR, diharapkan dapat mengatasi masalah ini.
- Munculnya pita-pita terdifusi yang hilang pada daerah 100 sampai 200 bp di dalam gel. Hal ini menunjukkan adanya produk berantai tunggal tertentu. Hal ini dapat terjadi akibat konsentrasi primer yang salah atau degradasi salah satu primer. Oleh karena itu, ulangi reaksi PCR dengan menggunakan primer baru.
- Munculnya 'smear' atau 'awan debu' pada ujung fragmen target. Hal ini menunjukkan priming reaksi oleh produk tertentu dari amplifikasi dan umumnya merupakan hasil dari konsentrasi primer yang terlalu rendah. Ulangi PCR dengan konsentrasi primer yang lebih tinggi.

---

## 4.7 Latihan Soal

**Jawablah pertanyaan berikut dengan benar!**

1. Bagaimana prinsip amplifikasi DNA menggunakan metode PCR?
2. Adakah jenis DNA polimerase selain yang dihasilkan oleh *Thermus aquaticus* (*Taq*) dalam amplifikasi DNA? Sebutkan!
3. Sebutkan dan jelaskan secara singkat tiga tahap utama dalam reaksi amplifikasi DNA?
4.  $MgCl_2$  merupakan salah satu komponen dalam PCR, apa fungsinya?
5. Apa yang dimaksud 'primer' dalam reaksi PCR? Jelaskan pula fungsinya?

---

# 5

## Elektroforesis Gel Agarosa

### 5.1 Capaian Pembelajaran

1. Mahasiswa mengetahui dan memahami komponen-komponen untuk pemisahan molekul DNA menggunakan metode elektroforesis gel agarosa
2. Mahasiswa mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi pemisahan molekul DNA menggunakan metode elektroforesis gel agarosa
3. Mahasiswa mampu mengetahui dan memahami solusi untuk menangani permasalahan dalam pemisahan molekul DNA menggunakan metode elektroforesis gel agarosa

### 5.2 Pendahuluan

DNA dapat dipisahkan menggunakan metode elektroforesis.

Bab ini membahas tentang konsep elektroforesis gel agarosa dan semua faktor penting yang mempengaruhi pemisahan pita DNA secara optimal dalam gel tersebut. Protokol tambahan untuk menjalankan gel agarosa standar dan resolusi tinggi juga dibahas dalam bab ini, termasuk metode isolasi fragmen DNA dari gel elektroforesis.

### 5.3 Prinsip Dasar Elektroforesis

Prinsip elektroforesis berdasarkan pada perbedaan muatan listrik.

Ketika suatu molekul ditempatkan pada suatu medan listrik, maka molekul tersebut akan

---

berpindah (bermigrasi) ke kutub (elektroda) yang sesuai berdasarkan kecepatan atau mobilitas elektroforesis bebas, sebagaimana dirumuskan sebagai berikut:

$$M_0 = \frac{E}{d} \frac{q}{6\pi R\eta} \quad (5.1)$$

dimana: E adalah beda potensial antara elektroda yang diukur dalam volt (V); q adalah muatan bersih molekul; d adalah jarak antar elektroda (cm);  $\eta$  adalah viskositas larutan; R adalah jari-jari Stock dari molekul, dan E/d adalah kekuatan medan.

Dalam kondisi fisiologis, karena gugus fosfat dalam tulang punggung gula-fosfo DNA (RNA) terionisasi, maka polianion ini akan bermigrasi ke elektroda positif (anoda) ketika ditempatkan dalam medan listrik. Karena sifat berulang dari tulang punggung gula fosfo, molekul DNA untai ganda memiliki muatan bersih terhadap rasio massa yang kira-kira sama. Hal ini menghasilkan mobilitas elektroforesis bebas molekul DNA ( $M_0$ ) yang kira-kira sama, terlepas dari ukurannya. Namun, dengan mengatur viskositas medium elektroforesis, seseorang dapat menonjolkan efek gesekan pada mobilitas molekul. Jika viskositas sangat besar, mobilitas molekul yang dikenai elektroforesis akan sangat bergantung pada bentuk dan ukurannya. Oleh karena itu, persamaan 5.1 disederhanakan menjadi:

$$M_0 = \frac{E}{d} \frac{1}{R} \quad (5.2)$$

Untuk meningkatkan viskositas media elektroforesis, matriks pendukung khusus dapat digunakan, seperti agarosa dan poliakrilamida. Memvariasikan ukuran pori menggunakan berbagai konsentrasi agarosa atau rasio ikatan silang yang berbeda pada poliakrilamida dapat mengubah viskositas kedua bahan tersebut. Mobilitas molekul DNA sangat dipengaruhi oleh ukuran dan bentuk molekul, serta ukuran pori matriks. Menggunakan gel ini, molekul DNA dipisahkan berdasarkan

---

ukuran dan konformasinya dengan cara yang relatif cepat dan mudah.

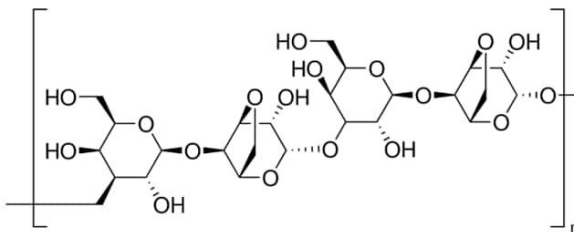
#### 5.4 Elektroforesis Gel Agarosa

Teknik elektroforesis gel agarosa relatif sederhana, cepat dilakukan, dan dapat disesuaikan dengan aplikasi analisis atau preparasi lain.

Pada hampir setiap percobaan yang bersinggungan dengan asam nukleat membutuhkan penggunaan elektroforesis gel agarosa. Teknik ini sederhana, cepat dan dapat disesuaikan dengan aplikasi analisis atau preparasi

lain.

Agarosa adalah polisakarida yang terdiri atas unit agarobiosa dasar berulang ikatan 1,3 B-D-galactopyranose dan ikatan 1A- 3,6-anhydro-a-L-galactopyranose. Unit-unit ini membentuk rantai panjang sekitar 400 pengulangan, mencapai berat molekul sekitar 120.000 dalton. Rantai polimer panjang mengandung sejumlah kecil residu bermuatan, sebagian besar terdiri atas piruvat dan sulfat. Residu ini bertanggung jawab atas sifat agarosa yang penting dalam penggunaannya dalam elektroforesis gel.



**Gambar 5.1** Struktur molekul agarosa.

Fenomena 'elektroendosmosis' (EEO) adalah landasan penting dalam elektroforesis. Selama elektroforesis, hanya ion positif terhidrasi, yang secara normal terikat dengan kelompok tetap anionik agarosa (residu piruvat atau sulfat) dan dapat bergerak menuju katoda. Oleh karena itu, air akan ditarik dengan ion positif ini menuju elektroda negatif. Sementara itu, molekul

---

negatif, seperti DNA yang bermigrasi menuju elektroda positif, akan bergerak secara lambat. Pada elektroforesis DNA, agarosa yang memiliki tingkat EEO terkecil sangat direkomendasikan untuk pemisahan molekul DNA secara maksimum.

Laju migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa tergantung pada parameter berikut:

- Ukuran molekul DNA.
- Konsentrasi gel agarosa.
- Tegangan yang digunakan.
- Konformasi DNA.
- Bufer yang digunakan untuk elektroforesis.

#### 5.4.1 Mobilitas fragmen DNA

Molekul DNA akan bergerak melalui gel dengan kecepatan yang berbanding terbalik dengan logaritma berat molekul atau jumlah pasangan basanya.

Pada tahap pertama, molekul DNA akan bergerak melalui gel dengan kecepatan yang berbanding terbalik dengan logaritma berat molekul atau jumlah pasangan basanya. Dengan demikian, plot mobilitas terhadap log ukuran harus memberikan garis lurus untuk semua ukuran DNA. Namun, hal ini berlaku untuk rentang ukuran DNA yang sempit. Hubungan linier yang lebih baik antara mobilitas dan ukuran DNA diperoleh dalam plot jumlah pasangan basa DNA (ukuran DNA) versus  $1/\text{mobilitas}$ .

Penggunaan rentang mobilitas linier sangat bergantung pada konsentrasi gel dan tegangan yang digunakan. Fragmen DNA dengan ukuran tertentu akan bermigrasi dengan kecepatan berbeda dalam gel yang mengandung konsentrasi agarosa yang berbeda pula. Suatu model untuk struktur gel menggambarkan bahwa log mobilitas molekul DNA yang berbeda ( $M$ ) sebagai fungsi dari konsentrasi gel ( $C$ ) akan menghasilkan garis lurus dengan kemiringan yang berbeda atau disebut koefisien retardasi

---

(K) dan perpotongannya disebut mobilitas bebas ( $M_i$ ). Oleh karena itu, mobilitas molekul DNA pada konsentrasi agarosa nol dapat dinyatakan secara matematis dengan persamaan berikut:

$$\text{Log } M = \text{log } M_0 - CK_r \quad (5.3)$$

Penggunaan gel agarosa dengan konsentrasi yang berbeda, sangat dimungkinkan untuk memisahkan berbagai ukuran fragmen DNA. Namun, gradien tegangan yang digunakan pada gel juga harus disesuaikan dengan benar. Secara umum, laju migrasi fragmen DNA berbanding lurus dengan tegangan yang diberikan. Namun, ketika tegangan ditingkatkan, molekul DNA besar akan bermigrasi dengan kecepatan proporsional lebih cepat daripada molekul kecil. Akibatnya, kekuatan medan yang digunakan pada sebagian besar gel harus berkisar antara 0,5 V/em dan 10 V/em. Secara umum, resolusi lebih tinggi akan dicapai pada gradien tegangan rendah, terutama jika digunakan DNA dengan berat molekul lebih tinggi. Molekul DNA kecil harus dipisahkan pada gradien tegangan yang lebih tinggi untuk mencegah difusinya selama elektroforesis. Jumlah DNA dalam sampel juga akan mempengaruhi mobilitas yang tampak. Fragmen DNA dengan beban lebih akan tampak bergerak lebih cepat daripada fragmen dengan jumlah DNA sebenarnya. Oleh karena itu, jumlah DNA yang dimasukkan ke dalam setiap sumur sampel (gel) harus serupa ketika akan membandingkan mobilitas fragmen DNA.

#### 5.4.2 Konformasi DNA

Bentuk (konformasi) DNA dapat mempengaruhi laju migrasi.

Bentuk (konformasi) DNA juga mempengaruhi laju migrasi. Sebagai contoh, DNA plasmid akan tetap ada dalam tiga keadaan konformasi, yaitu: molekul superkoil melingkar tertutup (bentuk I); molekul renggang melingkar berpotongan (bentuk II); dan molekul linier

---

(bentuk III). Introduksi potongan untai tunggal dapat mengubah molekul bentuk I menjadi bentuk II. Sementara itu, introduksi potongan untai ganda ke dalam molekul superkoil (bentuk I) dapat mengubahnya menjadi molekul linier (bentuk III). Dengan demikian, bentuk II dan III adalah hasil kerja nuklease selama pemurnian plasmid dan tidak boleh ada dalam preparat DNA plasmid yang diisolasi menggunakan prosedur basa.

Mobilitas relatif dari ketiga bentuk tersebut sangat bergantung terutama pada konsentrasi agarosa. Adapun pada tingkat yang lebih rendah, sangat bergantung pada kekuatan arus yang digunakan dan kekuatan ionik bufer. Dalam sebagian besar kondisi, DNA superkoil (bentuk I) akan bermigrasi lebih cepat daripada DNA linier (bentuk III) dengan ukuran yang sama. Sementara itu, DNA sirkular (bentuk II) akan bermigrasi lebih cepat daripada DNA superkoil dalam bufer TAE dan lebih lambat dari DNA superkoil dalam bufer TBE.

Tabel 5.1 menyajikan saran tentang penggunaan konsentrasi agarosa dan kekuatan medan listrik dalam pemisahan fragmen DNA menggunakan elektroforesis.

Kehadiran etidium bromida dalam gel dapat mengubah mobilitas DNA secara drastis, hal ini terjadi karena perubahan jumlah dan arah putaran superheliks dalam DNA bentuk I. Ketika konsentrasi etidium bromida meningkat, maka putaran superheliks negatif dalam molekul DNA bentuk I secara progresif akan hilang dan laju migrasinya akan melambat. Penggabungan lebih banyak etidium bromida ke dalam molekul-molekul ini dapat menyebabkan perubahan superheliks positif menjadi molekul yang menghasilkan peningkatan mobilitas elektroforesisnya.

Dalam aturan umum, dalam bufer TAE, DNA plasmid akan bermigrasi dalam 0,8-1% gel dengan sekuen sebagai berikut (dari molekul yang lebih lambat ke yang lebih cepat, atau membaca



dari bawah): DNA linier (bentuk III) DNA superkoil (bentuk I) dan, DNA sirkular renggang (bentuk II). Dalam bufer TBE, urutan ini adalah sebagai berikut: DNA sirkular renggang (bentuk II), DNA linier (bentuk III) dan DNA superkoil (bentuk I).

**Tabel 5.1** Saran penggunaan konsentrasi agarosa dan kekuatan medan listrik untuk pemisahan optimal fragmen DNA.

Konsentrasi agarosa (% w/v)	Ukuran fragmen DNA (bp) <sup>a</sup>			Kekuatan medan listrik (V/cm) <sup>b</sup>
	SeaKem®	Metaphor®	SeaPlaque®	
0,60-0,75	1.000-23.000	n/a	500-25000	0,5-1,0
0,80	800-10.000	n/a	500-20.000	0,5-1,0
1,00	400-8.000	n/a	300-20.000	1,0-2,0
1,20-1,25	300-7.000	n/a	200-12.000	1,0-2,0
1,50	200-4.000	n/a	150-6.000	2,0-3,0
1,75	150-2.000	n/a	100-3.000	2,0-3,0
2,00	100-3.000	150-800	50-2.000	2,0-3,0
3,00	n/a	100-600	n/a	2,0-3,0
4,00	n/a	50-25	n/a	2,0-3,0
5,00	n/a	2-130	n/a	2,0-3,0

<sup>a</sup> dimodifikasi dari data katalog BioProducts FMC.

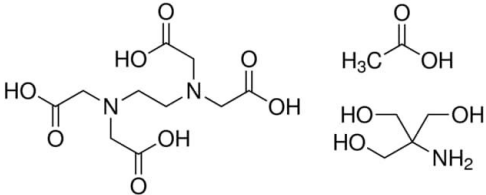
### 5.4.3 Bufer elektroforesis

TAE, TBE dan TPA adalah bufer yang lazim diaplikasikan dalam elektroforesis.

Beberapa bufer yang berbeda dapat digunakan untuk elektroforesis gel agarosa. Tiga diantaranya adalah: **Tris-acetate EDTA (TAE)**, **Tris-borate EDTA (TBE)** dan **Trisphosphate EDTA (TPA)**.

**Tris-acetate EDTA (TAE)** adalah larutan bufer yang paling sering digunakan untuk elektroforesis DNA. Bufer ini tersusun atas 40 mM Tris-base, 20 mM asam asetat dan 1mM EDTA (Gambar 5.2). Secara umum, TAE memiliki kapasitas bufer yang relatif rendah, sehingga memerlukan resirkulasi bufer pada elektroforesis yang lama jika dua tangki elektroforesis digunakan.

Buf er ini sangat cocok untuk elektroforesis gel ‘bawah laut’ atau terendam, karena memerlukan waktu singkat pada gradien tegangan relatif tinggi tanpa pemanasan berlebih. Rasio tegangan yang digunakan pada arus (mA) kira-kira satu, untuk berbagai ukuran gel dan volume bufer ketika digunakan (Perbal, 1988). Pewarna penanda, seperti bromofenol biru, akan berjalan dalam bufer ini, dengan kecepatan sekitar 1 cm/jam pada kekuatan medan 1 sampai 10 V/cm. Dengan demikian, pewarna penanda ini akan bermigrasi bersama dengan molekul DNA terkecil pada setiap konsentrasi agarosa (lihat Tabel 5.2).



**Gambar 5.2** Struktur molekul TAE.

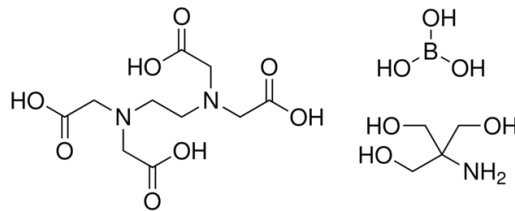
**Tabel 5.2** Migrasi fragmen DNA relatif terhadap bromofenol biru.

Konsentrasi agarosa (%)	Ukuran fragmen DNA yang bermigrasi bersama dye dalam TAE (bp)			Ukuran fragmen DNA yang bermigrasi bersama dye dalam TBE (bp) (%)		
	A	B	C	A	B	C
0,60-0,75	1000	n/a	500	720	n/a	250
0,80	900	n/a	500	700	n/a	200
1,00	500	n/a	350	400	n/a	180
1,20-1,25	370	n/a	200	260	n/a	100
1,50	300	n/a	150	200	n/a	70
1,75	200	n/a	100	110	n/a	50
2,00	150	70	60	70	40	30
3,00	n/a	40	n/a	n/a	35	10
4,00	n/a	35	n/a	n/a	30	n/a
5,00	n/a	30	n/a	n/a	15	n/a

Note: A= SeaKem®; B = Metaphor®; C= SeaPlaque®

---

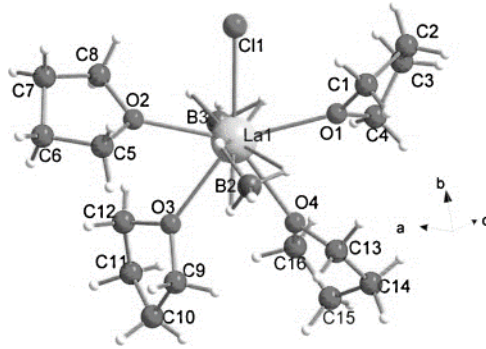
**Tris-borate EDTA (TBE)** adalah bufer yang memiliki kapasitas bufer yang sangat tinggi. Bufer ini tersusun atas 89 mM Tris-base, 89 mM asam borat dan 2 mM EDTA (Gambar 5.3). Bufer ini dapat digunakan untuk DNA berukuran kurang dari 12.000 bp dan memberikan hasil pemisahan yang lebih baik daripada TAE untuk memisahkan fragmen DNA berukuran kurang dari 1000 bp. Mobilitas DNA dalam bufer ini kira-kira dua kali lebih lambat daripada bufer TAE. Hal ini disebabkan oleh porositas yang lebih rendah dari gel agarosa ketika senyawa tersebut berpolimerisasi dengan adanya borat.



**Gambar 5.3** Struktur molekul TBE.

Kekuatan ionik TBE yang tinggi akan menghasilkan rasio tegangan terhadap arus (mA) 4:1 selama elektroforesis untuk berbagai ukuran gel dan volume bufer. Secara umum, fragmen DNA akan terlihat lebih tajam ketika bufer TBE digunakan tetapi waktu elektroforesisnya jauh lebih lama.

Keuntungan penting dari TBE adalah bakteri atau jamur tidak dapat tumbuh dalam larutan bufer IX, sehingga memungkinkan untuk menyimpannya pada suhu kamar. Kelemahan yang cukup signifikan adalah bahwa borat dapat berinteraksi dengan gugus hidroksil pada polisakarida agarosa, sehingga membentuk kompleks tetra borohidrida (Gambar 5.4). Kompleks ini dapat mengganggu aksi agen chaotropic yang digunakan untuk melarutkan gel agarosa dalam prosedur re-isolasi fragmen DNA. Dengan demikian, bufer TBE tidak dapat digunakan dalam prosedur pengikatan silika untuk re-isolasi fragmen DNA.



**Gambar 5.4** Contoh kompleks tetra boro hibrida.

**Bufer tris-fosfat-EDTA (TPE)** terdiri atas 89 mM Tris-base, 23 mM  $H_3PO_4$ , dan 2,5 mM EDTA. Bufer ini memiliki kapasitas penyangga yang tinggi, sebanding dengan TBE. Sementara itu, mobilitas DNA dalam bufer TPE hampir mirip dengan TAE, karena ukuran pori yang sama terbentuk selama polimerisasi. Bufer TPE memiliki kekuatan ionik tinggi yang menghasilkan rasio tegangan (V) terhadap arus (mA) yang serupa dengan yang diperoleh pada TBE. Namun, TPE memiliki keunggulan lain dibandingkan TBE, yaitu gel dapat dilarutkan kembali dalam agen chaotropic terkonsentrasi. Sehingga, re-isolasi fragmen DNA menggunakan prosedur pengikatan bubuk silika sangat mungkin dilakukan.

#### 5.4.4 Ukuran gel

Elektroforesis gel agarosa umumnya dilakukan dengan menggunakan gel 'slab' horizontal (terendam).

Elektroforesis gel agarosa umumnya dilakukan dengan menggunakan gel 'slab' horizontal (terendam). Pemisahan terbaik antara fragmen DNA dalam sistem seperti ini

dapat dicapai dalam gel dengan panjang kira-kira 20 cm, lebar 15 cm, dan tebal sekitar 4 mm. Elektroforesis harus dilanjutkan sampai fragmen yang diinginkan bermigrasi 1/2 sampai 2/3 panjang gel. Untuk mendapatkan resolusi maksimum dari banyak

---

fragmen, maka elektroforesis harus dilanjutkan sampai pewarna penanda (misalnya, bromofenol biru) telah berpindah sebesar 70% hingga 80% dari panjang gel. Ukuran sampel yang baik juga dapat mempengaruhi resolusi fragmen DNA.

Panjang optimal sumur sampel untuk gel ukuran besar adalah 0,5 hingga 1,0 cm, dan lebar sumur optimal 1,0 hingga 2,0 mm. Dasar sumur sampel harus berukuran 0,5 hingga 1,0 mm di atas dasar gel. Minigel umumnya memiliki sumur sampel dengan panjang 0,2 hingga 0,5 cm dan lebar 1 mm (atau kurang). Jarak antara sumur sampel harus kurang dari setengah panjang sumur untuk memastikan mobilitas fragmen DNA yang sebanding pada seluruh bagian gel. Gel berukuran besar harus direndam menggunakan setidaknya 1 liter bufer elektroforesis untuk mencegah pemanasan gel selama reaksi berlangsung.

#### 5.4.5 Konsentrasi sampel

Jumlah DNA yang dimasukkan ke dalam satu sumur elektroforesis dapat bervariasi tanpa mempengaruhi mobilitas DNA.

Jumlah DNA yang dimasukkan ke dalam satu sumur elektroforesis dapat bervariasi tanpa mempengaruhi mobilitas DNA. Untuk gel standar ukuran besar (lihat penjelasan sebelumnya), beban DNA dapat

bervariasi antara 1 hingga 10 ng per fragmen. Konsentrasi DNA di atas 100 ng per fragmen harus dihindari, karena dapat membebani gel analitik. Jumlah total DNA yang dimasukkan pada setiap sumur elektroforesis juga tidak boleh melebihi 10 µg. Secara umum, seseorang harus menggunakan jumlah DNA yang lebih sedikit per sumur elektroforesis karena tegangan gel yang berjalan terus meningkat.

---

### 5.4.6 Loading dye

Sampel DNA yang akan dielektroforesis harus dipreparasi dengan menambahkan larutan pemberat atau 'loading dye'.

Sampel DNA yang akan dielektroforesis harus dipreparasi dengan menambahkan larutan pemberat atau 'loading dye'. Komposisi larutan loading dye berperan penting dalam memperoleh

fragmen DNA yang tajam. Larutan ini memiliki tiga fungsi penting, yaitu: dapat menghentikan reaksi enzimatik sebelum elektroforesis dilaksanakan (disebut larutan 'penghenti'), dapat memadatkan sampel DNA sebelum dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis, dan menyediakan jalan untuk memantau kemajuan elektroforesis.

Mayoritas *loading dye* mengandung EDTA untuk menghentikan reaksi enzimatik. Namun, senyawa ini seringkali tidak memadai untuk memisahkan kompleks DNA-protein secara menyeluruh. Oleh karena itu, keberadaannya tidak hanya akan mempengaruhi mobilitas fragmen DNA, tetapi juga dapat menyebabkan 'smear' dan pelebaran fragmen DNA secara berlebih. Untuk menghilangkan kompleks ini, semua larutan *loading dye* harus mengandung zat pendenaturasi protein, seperti urea dengan konsentrasi 5 M. Senyawa ini adalah agen pendenaturasi protein terbaik yang digunakan dalam larutan loading dye karena tidak berinteraksi dengan agarosa atau mempengaruhi mobilitas DNA.

Gliserol atau sukrosa, pada konsentrasi 5% sampai 10%, juga umum digunakan untuk meningkatkan densitas sampel DNA. Namun, penggunaan senyawa dengan berat molekul rendah ini dapat menghasilkan fragmen DNA berbentuk 'U', karena sampel mengalir ke sisi sumur sebelum elektroforesis dimulai. Efek ini terlihat terutama ketika elektroforesis dilakukan pada kekuatan medan listrik rendah. Untuk meningkatkan ketajaman fragmen

dan mencegah munculnya bentuk-U, Ficoll 400 pada konsentrasi 15% hingga 20%, harus digunakan untuk memberikan kepadatan.

Sejumlah pewarna berbeda digunakan sebagai pewarna pelacak. Bromophenol blue (biru tua) dan xylene cyanol FF (turquoise = hijau-biru) adalah dua pewarna yang paling sering digunakan. Tabel 2 dan 3 menyajikan hubungan antara migrasi pewarna ini dan fragmen DNA pada berbagai konsentrasi gel agarosa dalam dua bufer elektroforesis gel yang paling umum digunakan. Pewarna ini tidak dapat digunakan dalam gel agarosa alkali karena dapat terurai. Bromocresol green digunakan dalam gel tersebut. Pewarna pelacak yang berbeda juga digunakan seperti Tartrasine (oranye) atau Cresol merah (ungu). Pewarna ini biasanya digunakan dalam bufer reaksi PCR karena tidak mempengaruhi aktivitas Taq DNA polimerase. Hal ini memungkinkan penggunaan langsung produk PCR pada gel tanpa penambahan larutan pewarna yang dimuat.

**Tabel 5.3** Migrasi fragmen DNA menggunakan pewarna xilena cyanol<sup>a</sup>.

Konsentrasi agarosa (%)	Ukuran fragmen DNA yang bermigrasi bersama dye dalam TAE (bp)			Ukuran fragmen DNA yang bermigrasi bersama dye dalam TBE (bp)		
	A	B	C	A	B	C
0,60-0,75	9200	n/a	4000	7100	n/a	2850
0,80	8000	n/a	3000	6000	n/a	2000
1,00	6100	n/a	2300	4000	n/a	1700
1,20-1,25	4100	n/a	1500	2250	n/a	1000
1,50	2600	n/a	1000	1900	n/a	700
1,75	2000	n/a	700	1400	n/a	500
2,00	1500	480	550	1000	310	400
3,00	n/a	200	n/a	n/a	140	n/a
4,00	n/a	120	n/a	n/a	85	n/a
5,00	n/a	85	n/a	n/a	60	n/a

<sup>a</sup>Tabel disusun berdasarkan data katalog BioProducts FMC.

Note: A= SeaKem®; B = Metaphor®; C= SeaPlaque®

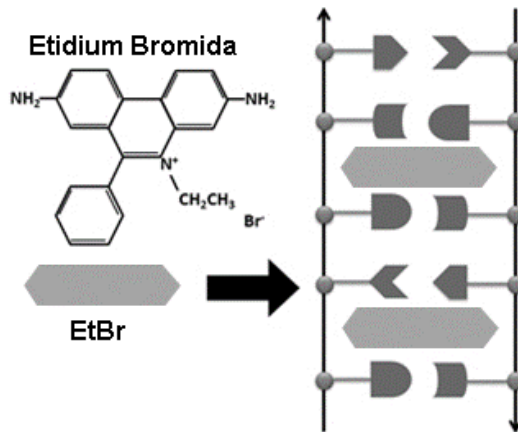
---

### 5.4.7 Pewarna gel

Etidium bromida (EtBr) adalah senyawa yang umum digunakan untuk mewarnai DNA dalam elektroforesis

Untuk memvisualisasikan DNA, gel agarosa umumnya diwarnai dengan etidium bromida (EtBr). Metode ini tergolong paling cepat,

sensitif dan dapat diulang untuk pewarnaan DNA untai tunggal dan ganda. Secara konsep, etidium bromida berikatan dengan asam nukleat untai ganda melalui interkalasi antara pasangan basa bertumpuk (Gambar 5.5). Dalam kondisi demikian, mobilitas DNA linier dalam elektroforesis gel berkurang sekitar 15%. Iradiasi ultraviolet etidium bromida pada 302 dan 366 nm akan diserap dan dipancarkan kembali sebagai fluoresensi pada 590 nm.



**Gambar 5.5** Interkalasi EtBr ke dalam molekul DNA.

Demikian pula, energi yang diserap oleh DNA yang disinari pada 260 nm ditransmisikan ke pewarna interkalasi dan dipancarkan kembali sebagai fluoresensi pada 590 nm. Intensitas fluoresensi zat warna yang terikat pada DNA jauh lebih besar daripada zat warna bebas yang tersuspensi dalam agarosa. Hal ini menghasilkan latar belakang yang sangat rendah dan intensitas fluoresensi yang tinggi dari fragmen DNA. Hasil pewarnaan



---

terbaik diperoleh dengan memasukkan etidium bromida ke dalam gel pada konsentrasi 0,5 ug/ml. Hal ini memungkinkan pengamatan langsung terhadap kemajuan elektroforesis dan membatasi jumlah limbah cair yang terkontaminasi etidium bromida.

Gel dapat diwarnai setelah elektroforesis dengan merendam gel dalam larutan yang mengandung 0,5 ug/ml etidium bromida selama sekitar 0,5 sampai 1 jam. Prosedur ini tidak dianjurkan karena kurang sensitif dibandingkan dengan memasukkan etidium bromida ke dalam gel dan menghasilkan sejumlah besar cairan yang terkontaminasi etidium bromida.

Dokumentasi paling sensitif dari DNA yang diwarnai dengan etidium bromida diperoleh ketika DNA disinari menggunakan sinar ultraviolet pada 254 hingga 260 nm daripada menggunakan penerangan langsung etidium bromida pada 300 nm. Gel agarosa juga dapat diwarnai dengan pewarnaan perak. Gel agarosa yang diwarnai dengan perak akan menghasilkan sensitivitas yang mirip dengan pewarnaan etidium bromida. Hasil terbaik diperoleh dengan penggunaan kit Silver Stain Plus yang diproduksi oleh BioRad Laboratories. Namun, pewarnaan ini memerlukan waktu yang lama dan tidak dapat digunakan untuk mengamati DNA selama elektroforesis atau ketika fragmen DNA akan diisolasi dari gel.

#### 5.4.8 Mendokumentasikan gel elektroforesis

Fragmen DNA dalam gel elektroforesis dapat didokumentasikan menggunakan kamera polaroid.

Dokumentasi gel elektroforesis tidak hanya memberikan catatan penting (permanen) tentang hasil percobaan, tetapi juga untuk analisis data dan visualisasi fragmen DNA yang tidak terlihat oleh mata telanjang. Kamera polaroid, yang dilengkapi dengan filter yang sesuai, lazim digunakan untuk

---

tujuan ini. Film cepat Polaroid tipe 667 (ASA 3000) yang paling umum digunakan dapat merekam fragmen DNA yang mengandung 2-4 ng ketika dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis 1 cm. Metode yang lebih sensitif untuk merekam hasil gel adalah penggunaan sistem pencitraan komputer yang dilengkapi dengan kamera digital *charge-couple device* (CCD). Sensitivitas sistem pencitraan komputer kira-kira sepuluh kali lebih besar daripada sensitivitas fotografi. Hal ini memungkinkan visualisasi dan perekaman DNA per fragmen paling sedikit 0,1 ng. Instrumen yang tersedia secara komersial untuk perekaman digital relatif mahal. Namun, modifikasi peralatan tersebut, menggunakan kamera murah, dapat memberikan hasil yang sebanding dengan instrumen komersial.

### 5.5 Elusi Fragmen DNA dari Gel Agarosa

Elusi fragmen DNA dari gel agarosa dapat dilakukan menggunakan empat cara, yaitu agarosa titik leleh rendah, digesti enzimatis, penggunaan garam 'chaotropic', dan pengikatan ke dalam partikel silika.s

Berbagai protokol yang memuakan untuk memurnikan fragmen DNA dari gel agarosa telah dikembangkan. Secara khusus, protokol tersebut dapat diklasifikasikan ke dalam empat kategori: elusi fragmen DNA

dengan elektroforesis, elusi dengan menggunakan agarosa titik leleh rendah atau digesti enzimatis polimer agarosa, melarutkan agarosa dengan garam 'chaotropic', dan mengikatkan fragmen DNA ke dalam partikel silika. Pertimbangan paling penting untuk memilih salah satu dari protokol ini adalah kecepatan teknik, hasil fragmen DNA dan kemurnian DNA yang diperoleh.

---

### 5.5.1 Elektroelusi

Elektroelusi mudah diulang untuk berbagai ukuran fragmen DNA dan menghasilkan DNA murni, namun memerlukan banyak waktu.

Metode elektroelusi diperkenalkan pada 1970-an, mudah diulang untuk berbagai ukuran fragmen DNA dan menghasilkan DNA murni. Kelemahan utama metode ini relatif melelahkan dan memerlukan banyak waktu. Fragmen DNA yang dielusi seringkali memerlukan pemurnian lebih lanjut untuk menghilangkan kontaminan yang terbawa bersama agarosa ketika elusi berlangsung. Ekstraksi pelarut organik atau matriks yang secara khusus mengikat fragmen DNA digunakan untuk menghilangkan kontaminan ini. Metode ini paling sering digunakan ketika diperlukan untuk mengisolasi fragmen DNA berukuran besar (lebih dari 10.000 kb) yang diperoleh dari metode lain.

Modifikasi unik yang dapat dilakukan dalam metode ini adalah penggunaan kertas Whatman DEAE selama elektroforesis. Sayatan di gel dibuat di depan fragmen DNA yang akan dielusi di mana kertas DE81 dimasukkan. Elektroforesis dilanjutkan sampai seluruh fragmen terserap ke atas kertas. Fragmen DNA dielusi dari kertas dengan bufer garam tinggi.

### 5.5.2 *Low-melting-point agarose*

*Low-melting-point agarose* memiliki kelebihan dalam mengisolasi kembali fragmen DNA jumlah besar, namun memerlukan biaya relatif tinggi dan daya kelarutannya rendah.

Metode ini menggunakan agarosa leleh suhu rendah untuk mengisolasi kembali fragmen DNA. Bagian agarosa yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dilebur pada suhu 65°C dan DNA diperoleh kembali baik dengan ekstraksi pelarut organik berulang atau penyerapan bubuk silika. Salah satu

---

keuntungannya dihasilkan fragmen DNA dalam jumlah besar. Keuntungan lainnya dapat melakukan reaksi enzimatik seperti ligasi, digesti-restriksi dan pelabelan fragmen DNA tanpa menghilangkan agarosa. Namun, metode ini memerlukan biaya relatif tinggi dan daya kelarutan yang rendah. Selain itu, re-isolasi fragmen DNA berukuran besar dari agarosa dengan titik leleh rendah kurang dapat diulang kembali dibandingkan dengan dua metode lainnya.

### 5.5.3 Enzim pendigesti agarosa

Metode alternatif untuk melarutkan gel adalah menggunakan enzim pencernaan agarosa. Namun metode ini memerlukan biaya tinggi dan waktu lebih lama.

Metode alternatif untuk melarutkan gel adalah menggunakan enzim yang dapat mendigesti agarosa. Berbagai modifikasi dari protokol ini telah diperkenalkan dengan menghilangkan kebutuhan untuk pemurnian lebih lanjut menggunakan

pelarut organik atau bubuk silika. DNA dipulihkan dengan presipitasi etanol dan siap untuk manipulasi selanjutnya. DNA dengan berat molekul besar dapat diperoleh kembali dengan efisiensi yang memuaskan. Kekurangan protokol enzimatik memerlukan biaya tinggi dan waktu relatif lama untuk mendigesti agarosa secara sempurna, terutama bila digunakan gel konsentrasi tinggi. Selain itu, penguraian agarosa dari beberapa sumber meninggalkan endapan tak larut air yang dapat dilihat oleh etanol yang mengganggu prosedur selanjutnya seperti digesti untuk ligasi dan restriksi.

---

#### 5.5.4 Serbuk (*powder*) silika

Pengikatan menggunakan powder silika merupakan metode yang paling sering digunakan untuk mengisolasi kembali fragmen DNA dari gel agarosa.

Metode ini pertama kali dijelaskan oleh Vogelstein & Gillespie (1979) dan saat ini merupakan metode yang paling sering digunakan untuk mengisolasi kembali fragmen DNA dari gel agarosa. Kelebihan utama metode ini

berdasarkan fakta bahwa pada konsentrasi tinggi garam 'chaotropic', DNA akan mengikat partikel silika secara selektif. Garam yang paling sering digunakan adalah natrium iodida atau guanidin tiosianat. Garam-garam ini tidak hanya mendorong pengikatan DNA ke dalam partikel silika, tetapi juga dapat melarutkan gel agarosa. Agarosa yang tidak terikat, garam, protein, nukleotida, dan oligonukleotida dapat dicuci dengan larutan bufer etanol. Sementara itu, DNA terikat dapat dilarutkan dalam bufer TE atau air volume kecil.

Dengan menggunakan metode ini, fragmen DNA dapat diisolasi kembali dengan ukuran antara 0,5 hingga 10Kb. Modifikasi metode awal memungkinkan re-isolasi fragmen DNA dengan panjang 100 hingga 500 bp. Saat ini, kit telah tersedia secara komersial dan beberapa vendor menawarkannya dengan harga kompetitif.

#### 5.6 Pewarnaan Gel untuk Re-isolasi DNA

Pewarnaan etidium bromida dan visualisasi fragmen DNA dengan iluminasi UV tidak boleh dilakukan ketika DNA akan diisolasi kembali dari gel agarosa.

Untuk mengisolasi kembali fragmen DNA dari gel agarosa menggunakan salah satu prosedur yang telah dijelaskan, maka DNA harus terlebih dahulu divisualisasikan pada gel. Namun, ketika DNA akan diisolasi kembali dari gel agarosa, pewarnaan

---

etidium bromida dan visualisasi fragmen DNA dengan iluminasi UV tidak boleh digunakan. Iradiasi DNA oleh sinar UV gelombang pendek dan etidium bromida, menghasilkan degradasi senyawa tersebut secara cepat. Hal ini telah ditunjukkan oleh viabilitas DNA lambda yang menurun sepuluh kali per satu detik pada iradiasi 260 nm.

Iluminator gel pada panjang gelombang 300 hingga 320 nm umumnya dianggap tidak menyebabkan kerusakan untai tunggal yang dapat dideteksi, bahkan setelah paparan beberapa menit. Oleh karena itu, iluminator gelombang panjang dapat digunakan untuk memvisualisasikan fragmen DNA untuk tujuan pemotongan. Namun, beberapa ikatan silang untai DNA yang terbatas dilaporkan terjadi selama iluminasi ini yang akhirnya mengganggu ligasi, kloning, dan priming yang efisien dalam percobaan PCR. Baru-baru ini dilaporkan bahwa hanya 1% DNA tetap utuh setelah 20 hingga 45 detik penyinaran sinar UV-B. Sehingga, ketika fragmen DNA divisualisasikan untuk pemotongan berikutnya dari gel, penggunaan iluminator UV gelombang panjang ternyata dapat menyebabkan kerusakan DNA.

Solusi untuk menangani kerusakan DNA telah dilaporkan. Metode pertama yaitu menghindarkan gel agarosa dari iluminasi sinar UV sama sekali dengan mewarnai gel dengan **kristal violet** atau **nil biru**. Metode kedua adalah menggunakan **cytidine** atau **guanodin** yang dimasukkan ke dalam bufer *running* gel untuk melindungi DNA dari kerusakan akibat sinar UV. Dalam metode ini, gel diwarnai menggunakan etidium bromida konsentrasi standar dan disinari dengan sinar UV untuk memvisualisasikan fragmen DNA. Dengan demikian, sensitivitas visualisasi fragmen DNA oleh etidium bromida tidak diabaikan dalam prosedur ini.

---

## 5.7 Latihan Soal

**Jawablah pertanyaan berikut ini dengan benar!**

1. Jelaskan prinsip dasar elektroforesis!
2. Sebutkan senyawa biomolekul yang dapat dipisahkan menggunakan metode elektroforesis!
3. Sebutkan dua larutan penyangga (bufer) yang lazim digunakan dalam elektroforesis! Jelaskan kelebihan dan kekurangannya!
4. Sebutkan dan jelaskan dua macam gel yang lazim digunakan dalam elektroforesis!
5. Sebutkan dan jelaskan secara singkat faktor-faktor yang mempengaruhi laju migrasi DNA dalam elektroforesis gel agarosa!
6. Etidium bromida (EtBr) adalah senyawa yang umum digunakan untuk mewarnai DNA dalam elektroforesis gel agarosa. Bagaimana senyawa ini berinteraksi dengan DNA?

---



---

## Daftar Pustaka

- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols*. Humana Press.
- Carson, S., Miller, H. B., Witherow, D. S., & Srougi, M. C. (2019). *Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual*. Elsevier Inc.
- El Sheikha, A. F., Levin, R., & Xu, J. (2018). *Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity, and Traceability*. John Wiley and Sons, Inc.
- Gjerde, D. T., Hoang, L., & Hornby, D. (2009). *RNA Purification and Analysis*. Wiley-VCH.
- Griffin, H. G., & Griffin, A. M. (1993). DNA Sequencing. In H. G. Griffin & A. M. Griffin (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 23, pp. 1–384). Humana Press.
- Kallen, G., Iddings, C. K., & Mizushima, M. (1997). *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual* (M. S. Clark (ed.)). Springer-Verlag.
- Liu, D. (2009). *Handbook of Nucleic Acid Purification*. CRC Press.
- Magdeldin, S. (2012). *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Intech.
- Munshi, A. (2012). *DNA Sequencing-Methods and Application*. Intech.
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag.
- van de Ven, M. T., Lanham, P. G., & Brennan, R. M. (1996). Isolation and Purification of Plant Nucleic Acids. In J. P. Clapp (Ed.), *Methods in Molecular Biology: PCR and Other Nucleic Acid Methods* (Vol. 50, pp. 1–410). Humana Press.
- Wilson, K., & Walker, J. (2022). *Principles Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press.

---

---

# Glosarium

**Agarosa** adalah polisakarida netral dengan struktur linear dari ulangan unit agarobiosa, yaitu disakarida yang terdiri dari D-Galaktosa dan 3,6-anhidro-L-galaktosa. Dalam bidang biologi molekuler, senyawa ini lazim digunakan sebagai media dalam analisis elektroforesis.

**Amplifikasi** adalah penggandaan sekuen DNA tertentu, melalui metode *in vitro* (lihat pula tentang PCR).

**Annealing** adalah pengenalan (perlekatan) suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri.

**Annealing temperature** ( $T_a$ ) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template (DNA) secara stabil. Suhu aneling yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu aneling yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik.

**Asam nukleat** adalah makromolekul biokimia yang kompleks, berbobot molekul tinggi, dan tersusun atas rantai nukleotida yang mengandung informasi genetik. Asam nukleat yang paling umum adalah asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA).

**CDA** (*Cetyldimethylethyl ammonium bromide*) merupakan senyawa amonium kuaterner yang bersifat kationik dan dapat digunakan sebagai agen pembasmi kuman (sterilisasi) yang sangat baik.

**CIA** (*Chloroform-isoamil*), seringkali digunakan bersama fenol dalam pemurnian DNA, terutama untuk mengikat protein, sebagian kecil RNA, lipida, dan polisakarida.

---

**CTAB** (*cetyltrimethyl ammonium bromide*) adalah salah satu larutan penyangga yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA tumbuhan. Senyawa ini merupakan surfaktan kationik.

**DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) adalah pewarna fluoresen yang berikatan kuat dengan region kaya adenin-timin dalam DNA. Senyawa ini diaplikasikan secara luas dalam mikroskop fluoresensi.

**Denaturasi** adalah sebuah proses yang didalamnya protein atau asam nukleat kehilangan struktur tersier dan sekunder akibat tekanan eksternal (panas) atau senyawa, misalnya asam kuat.

**DEPC** (*Diethyl pyrocarbonate*), juga disebut dietil dikarbonat, adalah senyawa untuk menginaktivasi enzim RNAase yang terdapat dalam larutan dan peralatan laboratorium.

**Deproteinisasi**, yaitu penghilangan protein dari cairan lisis atau 'lisat' saat ekstraksi.

**DNA** (*deoxyribonucleic acid*) merupakan senyawa asam nukleat yang berisi materi genetik yang khas pada setiap organisme, tersusun atas basa Adenin (A), Guanin (G), Timin (T), dan Sitosin (C).

**DNA polimerase** adalah enzim penting dalam replikasi DNA maupun perbaikan DNA. Enzim ini dapat mengkatalisasi reaksi polimerisasi deoksiribonukleotida menjadi untai DNA.

**DNA template** adalah rantai DNA yang mengkode atau mencetak rantai mRNA (kodon).

**DNase** merupakan enzim ekstraseluler yang dapat memotong untai DNA (menghidrolisis ikatan fosfofiester yang terdapat pada DNA) menjadi nukleotida yang larut dalam asam.

**EDTA** (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) adalah asam kompleks, berupa asam karboksilat poliamino yang biasa digunakan sebagai agensia pengkelat atau ligan beberapa ion atau unsur logam, terutama  $Fe^{3+}$  dan  $Ca^{2+}$ .

**Elektroforesis** adalah salah satu metode molekuler yang dapat memisahkan senyawa-senyawa yang bermuatan listrik, seperti asam nukleat (DNA/RNA) dan protein.

---

**Elongasi** (Ekstensi) adalah proses pemanjangan untai DNA baru, dimulai dari posisi primer yang telah menempel pada urutan basa nukleotida DNA target dan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan.

**EtBr** (*Ethidium bromide*), adalah senyawa fluoresen yang dapat berinterkalasi dengan (mengikat pada sela-sela pasangan basa) DNA, sehingga dapat diaplikasikan sebagai penanda dalam teknik elektroforesis gel agarosa.

**Kuantifikasi** adalah prosedur untuk mengetahui konsentrasi dan kualitas asam nukleat (DNA dan RNA) yang telah diekstraksi. Alat yang digunakan untuk kuantifikasi adalah spektrofotometer.

**LDS** (*Lithium dodecyl sulfate*) adalah surfaktan/detergen anionik yang dapat digunakan dalam sintesis nanomaterial dan aplikasi lain, seperti kromatografi. Senyawa ini dapat pula dijadikan substituen *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dalam elektroforesis suhu rendah.

**Melting temperature** ( $T_m$ ) atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk men-disosiasi / melepas ikatan. Suhu leleh primer yang digunakan harus sama untuk memastikan kinerja yang konsisten pada pasangan primer.

**mRNA** (*messenger-RNA*) adalah salah satu jenis RNA (*ribonukleat acid*) yang ditemukan di dalam sel dan berperan sebagai "pembawa pesan" kode dari DNA kepada rRNA untuk "dibaca" dan selanjutnya diterjemahkan (translasi) menjadi urutan protein.

**Oligo(dT)** adalah sekuen DNA pendek (primer) dapat digunakan dalam produksi cDNA dari mRNA yang mengandung ekor poli (A), melalui metode transkriptase terbalik (*reverse transcriptase*).

**PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode *in vitro* untuk menggandakan (amplifikasi) segmen DNA tertentu.

---

**Poliakrilamida** adalah molekul polimer yang diproduksi oleh polimerisasi unit akrilamida. Lazim digunakan dalam analisis elektroforesis, serta keperluan lain, seperti produksi lensa kontak lunak (softlens).

**Primer** adalah sekuen DNA pendek yang komplemen terhadap sekuen yang akan diamplifikasi, terutama dalam reaksi berantai polimerase (PCR). Batasannya, primer ini akan menempel pada kedua ujung sekuen DNA yang ingin diamplifikasi dengan arah yang berkebalikan.

**Primer-Dimer** adalah produk sampingan dalam reaksi berantai polimerase (PCR), terjadi akibat dua molekul DNA pendek (primer) saling terikat satu sama lain karena adanya ikatan basa komplementer pada primer tersebut.

**Pronase** adalah enzim yang tergolong protease dan lazim digunakan dalam prosedur pemurnian DNA, karena dapat mendigesti protein.

**Proteinase K** adalah enzim yang fungsinya hampir sama dengan pronase, yaitu dapat mendigesti protein, sehingga lazim digunakan dalam prosedur pemurnian DNA, namun berbeda secara spesifisitas.

**PVP** (*Polyvinylpyrrolidone*), lazim pula disebut polyvidone atau povidone, adalah polimer larut air yang terbuat dari monomer N-vinylpyrrolidone, berperan dalam pengikatan senyawa atau pembentukan film.

**RNA** (*Ribonucleic acid*) adalah molekul polimer asam nukleat yang terlibat dalam berbagai peran biologis tertentu, terutama dalam regulasi dan ekspresi gen. Senyawa ini tersusun atas Adenin (A), Guanin (G), Urasil (U), dan Sitosin (C).

**RNase A**, sering juga disebut bovine pankreatik ribonuklease, adalah enzim ribonuklease pankreas yang dapat memotong RNA untai tunggal.

**SDS** (*Sodium dodecyl sulfate*), terkadang pula disebut sodium lauryl sulfate (SLS), merupakan suatu senyawa organik (surfaktan anionik) yang banyak digunakan dalam produk pembersih, kosmetika dan farmasetikal, serta makanan.

---

**Sequencing**, dalam genetika dan biokimia, dapat diartikan sebagai penentuan struktur primer (sekuen primer) rantai biopolimer tidak bercabang yang menghasilkan penggambaran linear simbolik struktur molekul yang dianalisis. Misalnya, sekuen DNA yang disimbolkan dengan nukleotida-nukleotida penyusunnya, yaitu "A" (adenin), "T" (timin), "G" (guanin), dan "C" (sitosin).

**Spektrofotometri** adalah salah satu metode pengukuran kuantitatif dalam kimia analisis terhadap sifat refleksi atau transmisi cahaya suatu materi sebagai fungsi dari panjang gelombang.

**TAE** (*Tris Acetic EDTA*) adalah larutan penyangga yang mengandung campuran basa Tris, asam asetat dan EDTA. Dalam biologi molekuler, lazim digunakan dalam elektroforesis agarosa untuk pemisahan DNA dan RNA.

**TBE** (*Tris borate EDTA*) adalah larutan penyangga yang mengandung campuran basa Tris, asam borat dan EDTA. Paling sering digunakan dalam elektroforesis gel, termasuk sequencing DNA.

---



- Agarosa**, 22, 71, 72, 88, 95, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 123, 125
- Akrilamida**, 124
- Amplifikasi**, 124
- Annealing**, 38, 83, 84, 86, 92, 93, 94
- Asam nukleat**, 122, 123, 124
- CDA**, 121
- CIA**, 121
- CTAB**, 7, 9, 11, 12, 18, 19, 43, 122
- Denaturasi**, 48, 62, 82, 83, 92, 93
- DEPC**, 50, 63, 122
- Dialisis**, 28, 35, 36
- DNA**, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 51, 53, 54, 58, 62, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125
- DNA polimerase**, 82
- DNase**, 4, 7, 8, 9, 11, 24, 42, 43, 122
- EDTA**, 7, 8, 9, 25, 40, 43, 49, 105, 107, 108, 110, 122, 125
- Elektroforesis**, 72, 74, 95, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 119, 121, 122, 123, 124, 125
- Enzim**, 122
- EtBr**, 72, 73, 74, 112, 119, 123
- Eukaryotik**, 2, 46, 47, 52, 55
- Genom**, 1, 16, 37, 42, 85
- Kromatografi**, 123
- LDS**, 123
- Lisis**, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 26, 28, 34, 37, 38, 39, 122
- mRNA**, 34, 46, 47, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 122, 123
- PCR**, 1, 21, 46, 47, 61, 72, 75, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 98, 111, 118, 120, 121, 123, 124
- Plasmid**, 34, 37, 38, 39, 54, 103, 104
- Polimerase**, 122, 124
- Presipitasi**, 8, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 116
- Primer**, 88, 121, 123, 124, 125
- Primer-Dimer**, 124
- Prokaryotik**, 2, 46, 47, 52, 62

---

**Pronase**, 24, 25, 124

**Protein**, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14,  
15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25,  
26, 34, 37, 38, 42, 43, 45, 48, 49,  
50, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 67, 68,  
69, 110, 117, 121, 122, 123, 124

**Proteinase K**, 24, 25, 124

**Ribonuklease**, 26, 48, 49, 124

**RNA**, 2, 3, 12, 15, 18, 20, 21, 24,  
26, 27, 34, 37, 39, 42, 43, 45, 46,  
47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55,  
56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65,  
66, 70, 72, 73, 76, 79, 80, 100,  
120, 121, 122, 123, 124, 125

**RNase**, 21, 26, 27, 28, 42, 48, 49,  
50, 51, 53, 59, 61, 124

**RT-PCR**, 47

**Sarkosil**, 9, 10, 43

**SDS**, 123, 124

**Sekuen**, 121, 123, 124

**Sel**, 123

**Sentrifugasi**, 9, 10, 18, 21, 22, 23,  
24, 31, 32, 38, 39, 49, 50, 53, 58,  
60

**Silika**, 21, 22, 107, 108, 114, 115,  
116, 117

**Spektrofotometer**, 123

**Spektrofotometri**, 27, 40, 65, 66,  
71, 80, 125

**TBE**, 104, 105, 106, 107, 108, 111,  
125

**Transkripsi**, 45, 46, 50, 56, 73

**Tris**, 125

---

## Profil Penulis



**Dindin Hidayatul Mursyidin**, merupakan staf pengajar di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler, Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lambung Mangkurat. Tahun 2004, ia menyelesaikan pendidikan sarjana di bidang Biologi (Biokimia) di Universitas Gadjah Mada. Pada tahun 2011, ia menyelesaikan *Master of Science* di bidang Biologi (Genetika dan Biologi Molekuler), dan tahun 2018 menyelesaikan program Doktor nya di universitas yang sama di bidang Ilmu Biologi (Genetika dan Biologi Molekuler).

Buku ini adalah buku ketiga yang disusun Penulis, setelah Keragaman Genetik Padi Rawa Kalimantan Selatan (Penerbit Scripta Cendekia, 2021) dan Buku Ajar Biologi Sel (Penerbit Scripta Cendekia, 2022).

# Teknik Dasar Biologi Molekuler

Jilid 1

Secara ringkas, buku ajar “Teknik Dasar Biologi Molekuler” ini terdiri atas lima bab. Bab pertama, membahas mengenai isolasi dan purifikasi DNA. Sebagaimana diketahui, seiring permintaan berbagai analisis molekuler yang terus meningkat, seperti sidik-jari (fingerprint) DNA, pengembangan perpustakaan genom (genomic library), serta PCR (polymerase chain reaction) secara umum, maka isolasi DNA merupakan kegiatan penting yang harus dilakukan. Oleh karena itu, dalam bab ini dibahas secara terperinci, tentang tahapan isolasi DNA, komponen atau bahan yang digunakan dalam analisis tersebut, faktor-faktor yang mempengaruhinya, serta solusi untuk menangani permasalahan yang terjadi dalam isolasi DNA.



Jl. Hasan Basri, Kayutangi, Banjarmasin 70123

Telp/Fax. 0511-3305195

ANGGOTA APPTI (004.035.1.03.2018)