

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER
“DASAR-DASAR TEKNIK ISOLASI DNA DAN RNA”



Uhamka
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Oleh: Dr. Suci Lestari, M.Pd.

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
2021

DASAR-DASAR TEKNIK ISOLASI DNA DAN RNA

Tujuan Praktikum

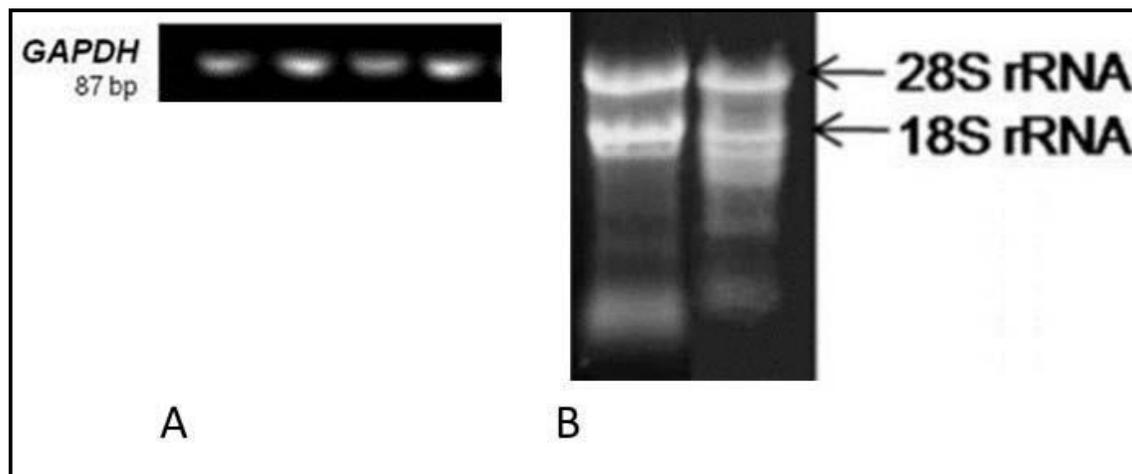
1. Mahasiswa mengetahui prinsip dasar isolasi DNA dan RNA dari sel prokariot dan eukariot.
2. Mahasiswa mampu mengetahui fungsi dari setiap bahan dan cara kerja dalam isolasi DNA dan RNA dari sel prokariot dan eukariot.

Pendahuluan

Penentuan metode isolasi DNA dan RNA dari beberapa tipe sel ditentukan oleh empat kriteria, yaitu: (1) efisiensi isolasi DNA atau RNA dari sampel; (2) jumlah molekul DNA atau RNA yang dihasilkan cukup untuk digunakan pada kebutuhan analisis selanjutnya; (3) keberhasilan dalam menghilangkan kontaminan; (4) berhasil mengisolasi DNA atau RNA dengan jumlah dan kemurnian yang tinggi. Hasil isolasi DNA yang tidak murni disebabkan karena masih terdapat sisa dari protein, lipid, garam, dan RNA. Sementara itu, hasil isolasi RNA yang tidak murni juga disebabkan karena masih ada sisa protein, lipid, garam, dan DNA.

Ada lima tahapan dasar dalam isolasi DNA dan RNA, yaitu (1) perusakan struktur sel sehingga menghasilkan lisat; (2) pemisahan molekul DNA atau RNA terlarut dari sisa-sisa sel dan materi tidak terlarut lainnya; (3) pengikatan molekul DNA atau RNA dengan molekul lain (matriks silica, magnet); (4) penghilangan protein dan kontaminasi lain dari matriks atau magnet; (5) elusi DNA atau RNA. Beberapa metode isolasi DNA yang umum digunakan adalah pemanasan pada suhu air mendidih, metode CTAB, metode Chelex 100, metode kolom silica, metode pelarut organik (phenol-chloroform), metode pelarut non-organik/garam (solid-phase), dan metode magnet beads. Sementara itu, metode isolasi RNA yang umum digunakan adalah metode CTAB, metode Guanidium Thyosianate/Trizol dengan kolom silica, dan metode magnet beads.

Kualitas isolasi DNA atau RNA yang baik dapat dilihat dari nilai kemurnian, konsentrasi, dan integritas. Integritas DNA atau RNA dapat dilihat melalui hasil pita dalam proses gel elektroforesis. Pita DNA akan menunjukkan satu pita dan pita RNA akan menunjukkan dua pita, yaitu 28S dan 18S rRNA. Kedua pita tersebut menunjukkan bahwa rRNA merupakan molekul RNA yang banyak ditemukan di sel yaitu 80-90% (Tan & Yiap 2009; Tavares dkk., 2011). Perbandingan pita DNA dan RNA pada gel elektroforesi dapat dilihat pada Gambar 1. berikut.



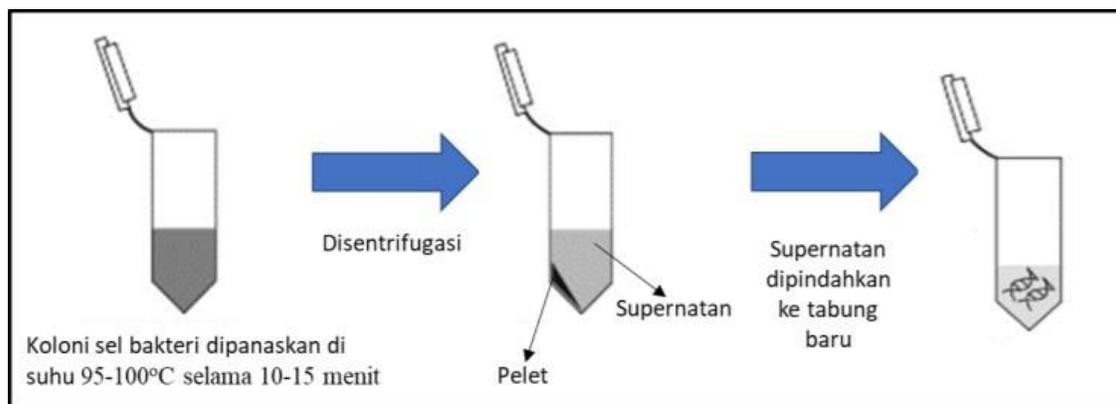
Gambar 1. Perbandingan pita DNA dan RNA hasil isolasi.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dari Sel Bakteri

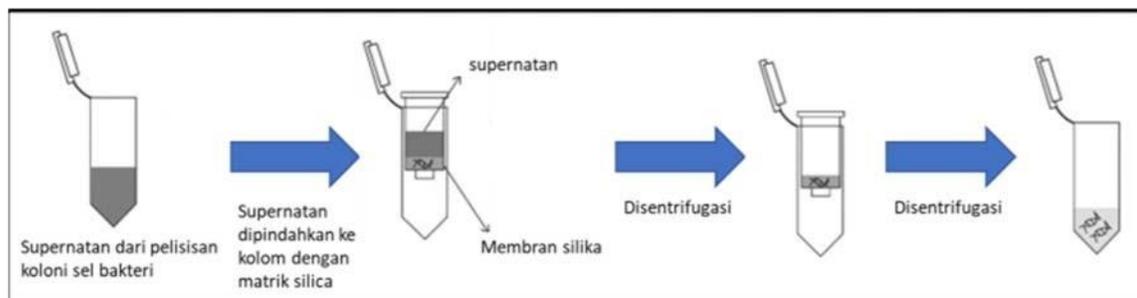
Sel bakteri tidak memiliki membrane inti sehingga materi genetic (DNA) terbatas pada daerah inti sel. Oleh karena itu, metode ekstraksi DNA dari sel bakteri dapat dilakukan dengan metode yang sangat sederhana misalkan metode pemanasan pada suhu air mendidih. Akan tetapi, beberapa sel bakteri memiliki peptidoglikan yang tebal (bakteri Gram positif) memerlukan teknik ekstraksi DNA yang lebih kompleks.

Metode pemanasan pada suhu air mendidih merupakan penyederhanaan dari proses ekstraksi DNA dengan menggunakan deterjen (SDS atau CTAB), enzim (lysozyme, proteinase K), fenol-kloroform, dan presipitasi etanol atau isopropanol. Prinsip kerjanya adalah proses pelisisan koloni sel bakteri dalam sebuah tabung yang dididihkan pada suhu 95-100°C selama 10-15 menit. Setelah itu, tabung yang berisi koloni sel tersebut disentrifugasi sehingga supernatan dapat digunakan untuk analisis selanjutnya (Gambar 2).



Gambar 2. Skematik ekstraksi DNA dari sel bakteri menggunakan metode pemanasan pada suhu air mendidih

Kemurnian DNA yang dihasilkan dari metode pemanasan pada suhu air mendidih adalah rendah sehingga tidak cocok digunakan untuk analisis selanjutnya yang memerlukan DNA hasil isolasi yang murni. Oleh karena itu, banyak metode yang menggunakan deterjen, pelarut organik, dan metode presipitasi yang menggunakan beberapa bahan berbahaya dan membutuhkan waktu pengerjaan lebih lama tetap digunakan. Semua metode tersebut pada prinsipnya sama, yaitu menggunakan kolom berbasis silika yang dapat mengikat DNA (Gambar 3).



Gambar 3. Skematik ekstraksi DNA dari sel bakteri menggunakan metode kolom silika.

Kebutuhan tingkat kemurnian DNA untuk beberapa analisis biologi molekuler mendorong

munculnya pendekatan baru pada metode ekstraksi DNA termasuk sel bakteri. Metode penambahan magnet beads pada supernatant hasil pelisisan saat ini digunakan untuk mengatasi kemungkinan masih adanya pengotor pada DNA hasil ekstraksi menggunakan kolom silika. Umumnya pengotor dari ion garam dan sisa alkohol pada proses pencucian di metode kolom silika sering menghambat reaksi PCR/qPCR. Oleh karena itu, penggunaan magnet beads dapat digunakan untuk mendapatkan DNA yang lebih murni (Gambar 4).



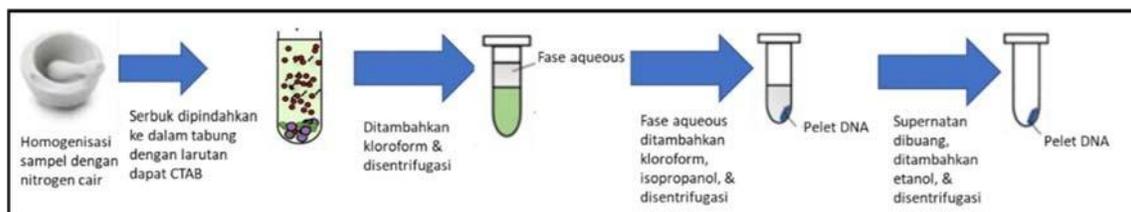
Gambar 4. Skematik ekstraksi DNA dari sel bakteri menggunakan metode magnet beads.

Isolasi DNA dari Sel Tumbuhan

Sel tumbuhan memiliki banyak komponen pengotor dalam memisahkan DNA dari sel seperti keberadaan polisakrida, protein, dan beberapa komponen inhibitor aktivitas DNA polymerase. Komponen inhibitor DNA polymerase contohnya adalah tannin, alkaloid, dan polifenol. Daun dan biji merupakan bagian tumbuhan yang memiliki variasi komponen dinding sel, yaitu banyak mengandung pati dan protein yang tinggi (Abdel-Latif & Osman 2017).

Metode ekstraksi menggunakan deterjen non-ionik cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) adalah metode yang banyak digunakan untuk isolasi DNA dari sel tumbuhan dari beragam spesies dan tipe jaringan. Banyak modifikasi yang telah dilakukan pada metode CTAB untuk optimasi hasil isolasi DNA dari berbagai spesies. Cara kerja metode CTAB sangat sederhana, cepat, dan dapat digunakan untuk variasi sampel jaringan yang akan diisolasi. Selain itu, tidak perlu tahapan yang membutuhkan cesium klorida (CsCl).

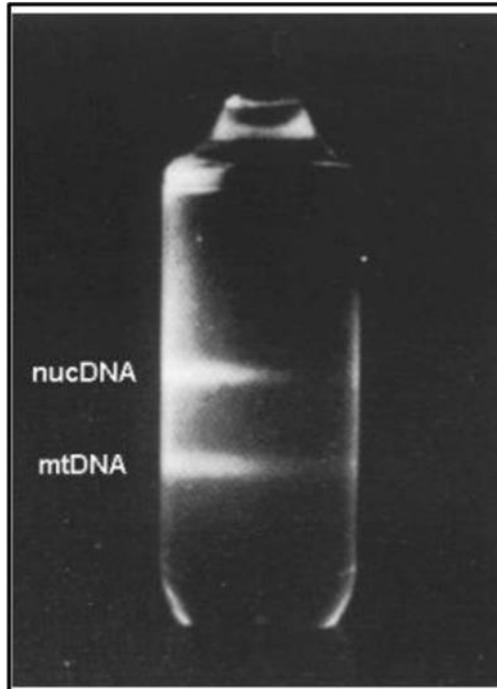
Larutan dapar CTAB 500uL dapat dibuat dengan komposisi 20 g CTAB, 2.56 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, 20 µL proteinase K (20 mg/mL). Selain itu, pada saat ekstraksi perlu 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) dan 2% (v/v) 2-mercaptoethanol. Homogenisasi sampel umumnya dilakukan dengan menuangkan nitrogen cair di sampel jaringan tumbuhan (Gambar 5).



Gambar 5. Skematik ekstraksi DNA dari sel tumbuhan menggunakan metode CTAB.

Metode isolasi DNA dari sel tumbuhan dapat juga dilakukan dengan menggunakan deterjen sarkosyl (N-lauroylsarcosine) untuk melisis sel. Sisa-sisa pelisisan sel berupa protein kemudian dihilangkan dengan menambahkan Proteinase-K. Molekul DNA kemudian dipresipitasi dan dimurnikan menggunakan cesium klorida (CsCl).

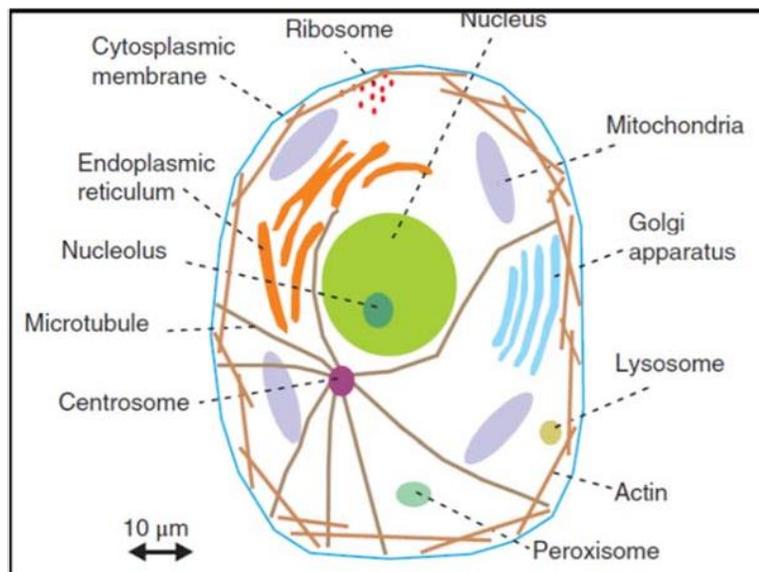
Metode CsCl merupakan metode yang dapat menghasilkan produk isolasi DNA yang spesifik. Hal tersebut dapat dilakukan karena karakteristik atom Cs^+ yang dapat menempel pada molekul DNA yang berbeda berdasarkan perbedaan komposisi guanin dan sitosin. Sebagai contoh pada molekul DNA inti yang memiliki berat molekul yang lebih kecil (linier) akan berada pada lapisan lebih atas daripada DNA mitokondria (sirkuler) (Gambar 6).



Gambar 5. Posisi DNA inti dan DNA mitokondria setelah penambahan CsCL dan sentrifugasi pada kecepatan 100.000rpm.

Isolasi DNA dari Sel Hewan

Sel hewan berbeda dengan sel eukariot lainya seperti sel tumbuhan karena tidak memiliki dinding sel (Gambar 6). Ketiadaan dinding sel pada hewan menyebabkan proses isolasi DNA pada sel hewan umumnya lebih sederhana daripada sel tumbuhan. Akan tetapi, untuk sel hewan yang sudah mengalami pengerasan atau keratinasi juga lebih kompleks proses isolasinya.



Gambar 6. Skematik penyusun sel eukariot. Sebagian besar DNA (90%) terletak di dalam inti. (Sumber: Waigh, 2014)

Sel darah merupakan bagian dari jaringan ikat hewan. Konsentrasi DNA dalam molekul darah mencapai 20-60 ug/ml dan tetap stabil meskipun setelah dilakukan purifikasi. Oleh karena itu, darah masih banyak digunakan sebagai sumber DNA untuk penelitian biologi molekuler.

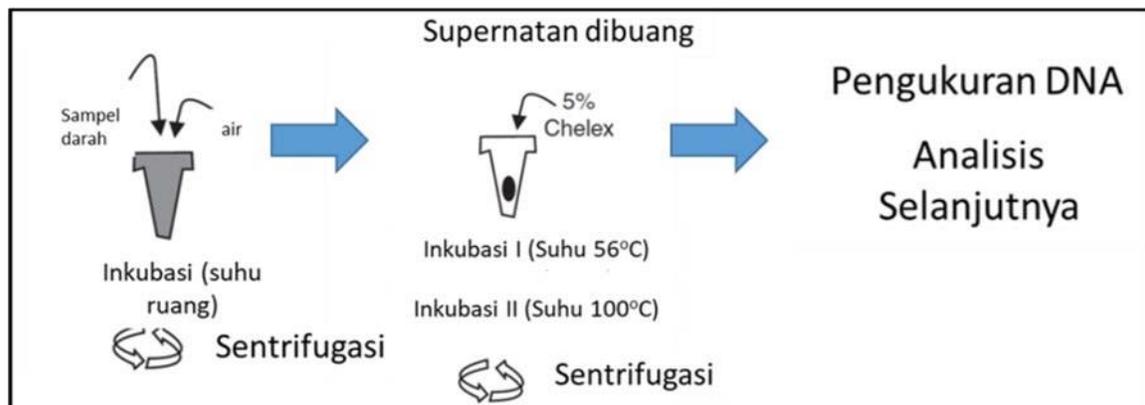
Metode ekstraksi DNA pada umumnya memiliki tahapan yang sama, karena adanya kesamaan dari struktur penyusun membrane sel dan membrane inti, adanya protease dan magnesium, dan struktur coiling DNA pada protein histon. Tahapan umum ekstraksi meliputi, pelisisan sel, memisahkan DNA dari komponen organel sel lain, dan mengisolasi DNA.

Membran sel dapat dirusak dengan proses pemanasan untuk meningkatkan fluiditas; menggunakan dithiothreitol (DTT) melemahkan ikatan disulfide; menggunakan detergen (SDS=sodium dodecyl sulfate) untuk merusak membran. Penggunaan chelating agent selain detergen dalam proses perusakan membrane sel juga berfungsi untuk menginaktivasi ion Mg^{2+} sehingga DNase tidak aktif.

Beberapa metode yang umum digunakan untuk ekstraksi DNA dari sampel darah, yaitu:

1. Metode Chelex

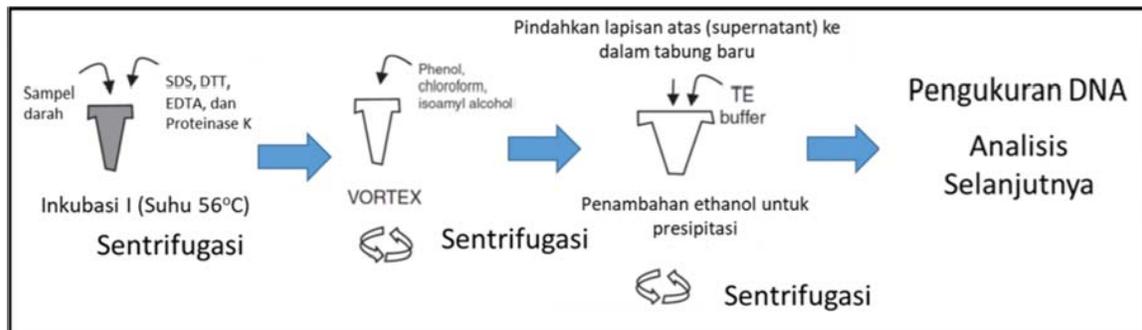
Penggunaan metode Chelex dalam ekstraksi DNA darah (Gambar 7) memiliki keunggulan berupa proses yang cepat dan jumlah sampel darah yang dibutuhkan sedikit. Ciri khas dari metode Chelex adalah adanya penggunaan Chelex 100 yang merupakan material yang berfungsi mengikat ion logam. Metode ini menggunakan pelarut organik. Kelemahan metode ini adalah adanya proses pemanasan pada suhu $100^{\circ}C$ sehingga DNA yang dihasilkan berupa untai tunggal dan memiliki keterbatasan untuk digunakan dalam analisis lebih lanjut (hanya untuk analisis PCR).



Gambar 7. Skematik ekstraksi DNA darah menggunakan metode Chelex.

2. Metode pelarut organik (*phenol-chloroform*)

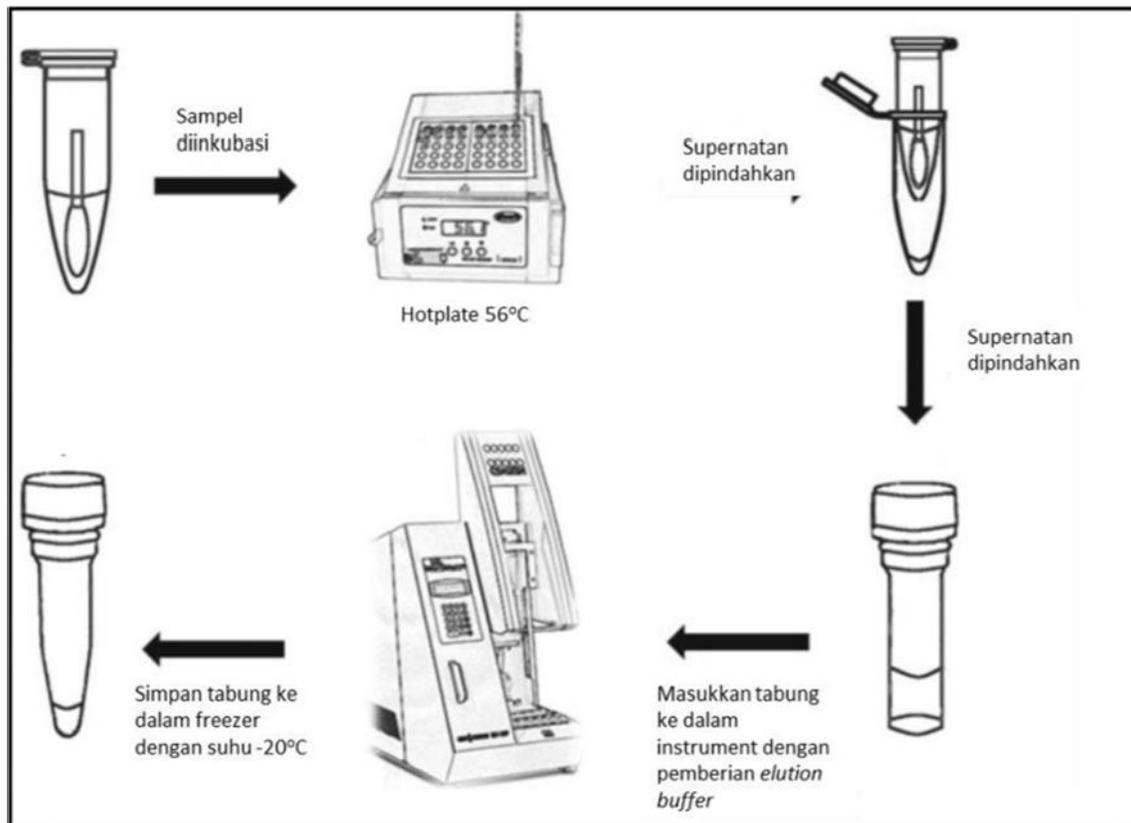
Ciri khas dari metode pelarut organik (Gambar 8) adalah menggunakan penambahan beberapa zat kimia dalam tahapan ekstraksi. Tahap pertama adalah penggunaan sodium dodecylsulfate (SDS) dan proteinase K untuk melisis protein yang mengikat DNA dalam kromosom. Tahap kedua adalah penambahan phenol-kloroform untuk memisahkan protein dengan DNA. Secara visual dapat terlihat dengan terbentuknya lapisan dari campuran organik dan pelarut. Lapisan paling atas akan berada paling atas dan digunakan untuk dipindahkan untuk analisis selanjutnya. Kekurangan metode ini adalah penggunaan phenol-kloroform yang berbahaya dan peluang terjadinya kontaminasi ketika proses pemindahan supernatant yang berisi DNA.



Gambar 8. Skematik ekstraksi DNA darah menggunakan metode pelarut organik (phenolchloroform).

3. Metode pelarut non-organik/garam (*solid-phase*)

Kit komersial saat ini banyak menggunakan metode berdasarkan pelarut nonorganik/garam (*solid-phase*). Alasan utamanya adalah metode ini yang paling mudah dan cepat dalam menghasilkan DNA yang bebas dari pengotor. Metode ini juga memungkinkan dilakukannya otomatisasi dengan menggunakan instrument khusus untuk keperluan jumlah sampel yang banyak. Ciri khas dari metode ini adalah penggunaan material silica untuk mengikat DNA sehingga bias dipisahkan dengan pengotornya. Selain itu, metode ini juga tidak menggunakan fenol-kloroform sebagai pelarutnya melainkan menggunakan larutan pelisis yang terdiri atas campuran tris base dan NaCl. Salah satu contohnya adalah kit komersil Qiagen EZ1 robot (Gambar 9).

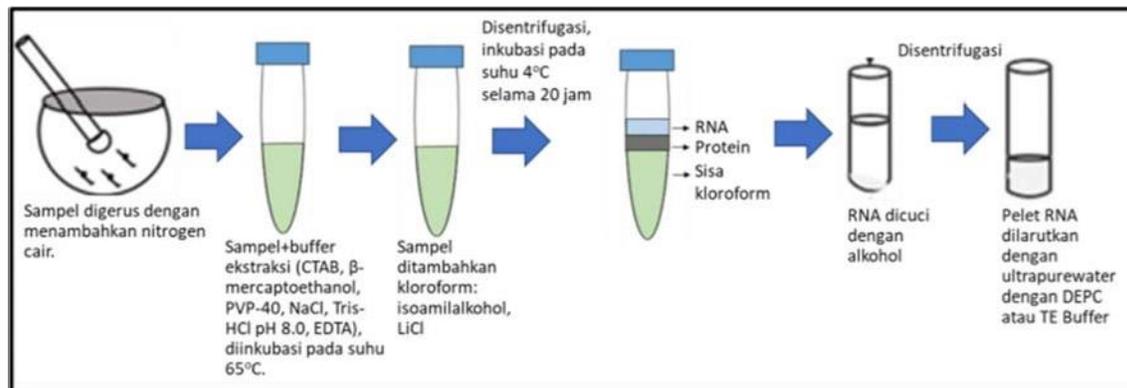


Gambar 9. Skematik kerja kit komersil Qiagen EZ1 robot menggunakan metode pelarut nonorganik/garam (*solid-phase*). (Sumber: Altayari, 2016)

ISOLASI RNA

Metode CTAB

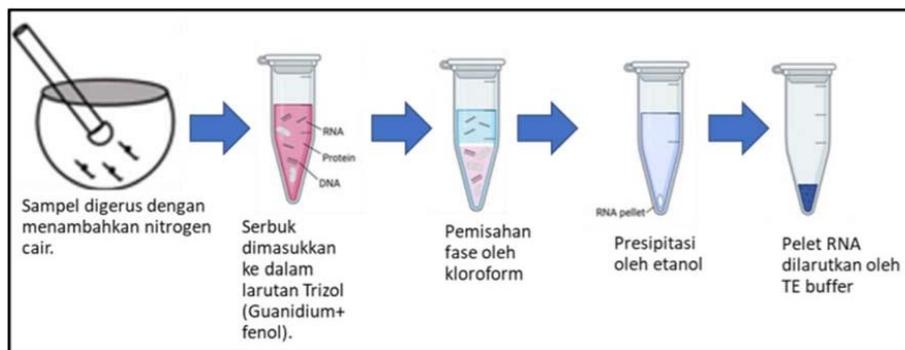
Isolasi RNA dari sel tumbuhan memiliki kemiripan yang sama dengan tahapan pada saat isolasi DNA. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) merupakan deterjen non-ionik yang memiliki kemampuan mempresipitasi asam nukleat dan polisakarida kompleks (selulosa, kitin, pektin) dari larutan dengan kekuatan ion lemah. Oleh karena itu, metode CTAB dapat digunakan untuk proses isolasi dari sel yang menghasilkan jumlah polisakarida dalam jumlah besar seperti tumbuhan, gram negatif, dan eksoskeleton serangga. Metode CTAB umumnya dikombinasikan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut organik, litium klorida (LiCl), dan presipitasi alkohol (Gambar 10).



Gambar 10. Skematik isolasi RNA menggunakan metode CTAB

Guanidium Thyosianate/Trizol dengan kolom silika

Metode isolasi DNA menggunakan guanidium thyosianate memiliki prinsip kerja memisahkan RNA dari sel berdasarkan prinsip garam kaotropik. Garam kaotropik memiliki karakteristik sebagai agen denaturasi protein. Perusakan inti sel dan organel menggunakan prinsip perusakan ikatan hydrogen sehingga struktur sel rusak dan RNA dapat keluar ke dalam larutan. Kelebihan metode isolasi RNA menggunakan guanidium thyosianate adalah kemampuan menghambat aktivitas RNAase. Akan tetapi, kontaminasi isolasi RNA menggunakan guanidium thyosianate karena konsentrasi garam menjadi lebih besar. Oleh karena itu, saat ini penambahan fenolkloroform pada guanidium thyosianate menghasilkan larutan dapar lisis yang disebut dengan TRizol menjadi metode yang banyak digunakan untuk isolasi dari sel hewan. Selain itu, TRizol menjadi alternatif untuk menggantikan penggunaan sesium klorida (CsCl) yang membutuhkan kecepatan tinggi untuk memisahkan DNA dan RNA (Gambar 11).



Gambar 11. Skematik isolasi RNA menggunakan metode Guanidium Thyosianate/Trizol

Magnet beads

Metode isolasi RNA berdasarkan prinsip medan magnet saat ini banyak digunakan. Beberapa partikel yang memiliki muatan magnetik dapat dibuat dari beberapa sintetik polimer, biopolymer, kaca berpori (silika), dan material anorganik lain seperti besi. Pemilihan material magnet beads didasari berdasarkan kemampuan medan magnet yang dilihat dari luas permukaan yang besar sehingga memiliki medan magnet yang besar juga.

Keuntungan metode isolasi menggunakan magnet beads adalah kebutuhan sampel yang sedikit, tetapi menghasilkan konsentrasi dan kemurnian yang tinggi. Hal tersebut dapat diperoleh melalui kombinasi partikel magnet yang diselimuti oleh material seperti membrane selulosa sehingga RNA dapat menempel dan kemudian dapat dicuci menggunakan etanol serta dipisahkan menggunakan larutan dapar elusi (larutan dapar TE) (Gambar 12).



Gambar 12. Skematik isolasi RNA menggunakan metode magnet beads.

Daftar Pustaka

- Abdel-Latif A. 1 dan Osman G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*,13:1-9.
- Altayari, W. 2016. DNA Extraction: Organic and Solid-Phase. Dalam: William Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1420, Springer Science+Business Media New York.
- Tan S.C. & Yiap B.C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009:1-10.
- Tavare, L., Alves P.M., Ferreira R.B., dan Santos C.N. 2011. Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC Research Notes*, 4(3):1-5.
- Waigh, T. A. 2014. *The Physics of Living Processes: A Mesoscopic Approach*, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd.

LEMBAR LATIHAN

Nama :
NIM :
Tanggal :
Kelompok :

A. Latihan Pemahaman Teori

1. Jelaskan perbedaan utama antara DNA dan RNA dari segi struktur kimia.

Petunjuk: Bahas tentang gula yang menyusun nukleotida, basa nitrogen yang digunakan, serta struktur untai.

.....
.....
.....
.....
.....

2. Mengapa penting untuk menghindari kontaminasi RNase dalam isolasi RNA?

Petunjuk: Apa efek RNase pada hasil isolasi RNA? Bagaimana RNase bisa mempengaruhi kualitas hasil.

.....
.....
.....
.....
.....

3. Apa keuntungan menggunakan metode fenol-kloroform dalam isolasi RNA dibandingkan metode lainnya?

Petunjuk: Pertimbangkan aspek kemurnian, waktu, dan efektivitas dalam pemisahan kontaminan.

.....
.....
.....
.....
.....

4. Apa fungsi dari buffer TE dalam penyimpanan DNA?

Petunjuk: Jelaskan mengapa DNA perlu disimpan dalam buffer tertentu dan bagaimana buffer TE bekerja.

.....
.....
.....
.....
.....

5. Mengapa kita menggunakan spektrofotometer untuk mengukur rasio A260/A280 pada sampel DNA atau RNA?

Petunjuk: Jelaskan hubungan antara rasio ini dengan tingkat kemurnian asam nukleat.

.....
.....
.....
.....
.....

B. Studi Kasus dan Analisis Data

Studi Kasus 1: Kuantifikasi DNA dan RNA

Seorang mahasiswa mengisolasi DNA dari sampel daun menggunakan metode lisis dan presipitasi etanol. Setelah melakukan kuantifikasi menggunakan NanoDrop, ia mendapatkan hasil sebagai berikut:

- Konsentrasi DNA: 300 ng/ μ L
- Rasio A260/A280: 1,5

1. Apa yang bisa Anda simpulkan dari rasio A260/A280 tersebut? Apakah DNA yang diperoleh memiliki kualitas yang baik? Jelaskan.

.....
.....
.....
.....
.....

2. Jika rasio A260/A280 rendah, kemungkinan besar ada kontaminasi. Apa kontaminan yang mungkin ada pada sampel DNA ini dan bagaimana cara memperbaikinya di prosedur isolasi?

.....
.....
.....
.....
.....

Studi Kasus 2: Isolasi RNA yang Gagal

Seorang peneliti mencoba mengisolasi RNA dari sel hewan. Namun, setelah menjalankan proses isolasi, ia mendapati bahwa konsentrasi RNA sangat rendah dan rasio A260/A280 berada di angka 1,2. Selain itu, ia tidak mendapatkan band RNA yang jelas saat melakukan elektroforesis.

1. Apa yang bisa menjadi penyebab rendahnya konsentrasi RNA dalam kasus ini? Jelaskan setidaknya dua kemungkinan faktor penyebab.

.....
.....
.....
.....
.....

2. Bagaimana Anda dapat memperbaiki atau mengoptimalkan metode isolasi RNA untuk menghindari hasil seperti ini di masa mendatang?

.....
.....
.....
.....
.....

C. Tantangan Eksperimen

1. Isolasi asam nukleat sering digunakan dalam penelitian forensik. Jika Anda diberi sampel jaringan yang sangat kecil (kurang dari 1 mg), bagaimana Anda akan menyesuaikan prosedur isolasi DNA/RNA agar tetap mendapatkan hasil yang optimal?*

Petunjuk: Pertimbangkan faktor-faktor seperti volume reagen, metode pengendapan, dan kualitas sampel

.....
.....
.....
.....

2. Dalam penelitian biologi molekuler, isolasi RNA sering dilakukan untuk analisis ekspresi gen melalui RT-PCR. Mengapa kualitas dan kemurnian RNA sangat kritis dalam eksperimen ini? Bagaimana kontaminasi DNA dapat mempengaruhi hasil RT-PCR?*

Petunjuk: Bahas peran RNA sebagai template dalam RT-PCR dan bagaimana kualitas yang buruk bisa memengaruhi hasil.

.....
.....
.....
.....

D. Tugas Kritis dan Refleksi

1. Jika dalam sebuah eksperimen Anda hanya memiliki waktu yang sangat terbatas, bagaimana Anda memutuskan untuk menggunakan metode isolasi DNA/RNA manual atau menggunakan kit komersial? Jelaskan kelebihan dan kekurangan masing-masing metode.

.....
.....
.....
.....

2. Refleksi: Setelah melakukan isolasi DNA/RNA, apa tantangan terbesar yang Anda hadapi? Bagaimana Anda mengatasinya, dan apa yang akan Anda lakukan berbeda di eksperimen berikutnya?

.....
.....
.....
.....

E. Diskusi Kelompok

1. Berdiskusi dengan kelompok Anda, apa saja kesalahan yang bisa dilakukan selama proses isolasi DNA/RNA yang dapat mempengaruhi hasil akhir? Bagaimana cara menghindari kesalahan tersebut?

.....
.....
.....
.....
.....

2. Diskusikan dengan kelompok Anda metode yang paling efisien dalam mengisolasi RNA untuk penelitian ekspresi gen. Apa saran Anda untuk pemilihan reagen dan alat untuk memastikan hasil RNA yang berkualitas tinggi?

.....
.....
.....
.....
.....

PENILAIAN

- Kesesuaian Jawaban: _____
- Analisis Data: _____
- Partisipasi Diskusi: _____
- Ketepatan Waktu: _____
- Refleksi dan Penyelesaian Tugas: _____