

**MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER**  
**“ISOLASI DNA DARI SEL BAKTERI, HEWAN, DAN TUMBUHAN”**



**Uhamka**  
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

**Oleh: Dr. Suci Lestari, M.Pd.**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI**  
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA**  
**2022**

# ISOLASI DNA DARI SEL BAKTERI, HEWAN, DAN TUMBUHAN

## Capaian Pembelajaran

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tahapan isolasi DNA dari sel bakteri, hewan, dan tumbuhan.
2. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip dasar dari isolasi DNA dari sel bakteri, hewan, dan tumbuhan.
3. Mahasiswa mampu mengaitkan fungsi bahan dan metode yang digunakan dalam isolasi DNA dengan karakteristik dari sel bakteri, hewan, dan tumbuhan.

## Pendahuluan

Ekstraksi asam deoksiribonukleat (DNA) adalah proses dimana DNA dipisahkan dari protein, membran, dan bahan seluler lainnya yang terkandung dalam sel dimana ia ditemukan. Proses ekstraksi DNA membutuhkan penanganan material biologis yang cermat untuk mencegah kontaminasi sampel dan tertukar. Tabung harus diberi label dengan hati-hati, terutama saat transfer diperlukan.

Sel bakteri terdiri dari membran luar bilayer lipid dan sitoplasma yang mengandung kromosom sirkular, protein, garam, ion logam, dan elemen sel lainnya. Metode konvensional dan paling sederhana untuk mengisolasi DNA bakteri adalah metode *Boiling*. Metode tersebut menggunakan panas untuk ekstraksi DNA. Paparan suhu tinggi akan menyebabkan kerusakan membran dan dinding sel. Suhu rendah juga dapat digunakan untuk menghancurkan dinding dan membran sel. Akan tetapi, pembekuan dapat mendorong pembentukan kristalisasi di dalam sel sehingga menyebabkan kerusakan struktur sitoplasma. Dalam prakteknya, pemanasan sel bakteri dilakukan dengan inkubasi dalam bak air panas atau di atas blok panas, atau menggunakan *microwave* untuk mengekstraksi DNA-nya.

Prinsip utama ekstraksi DNA umumnya mengikuti tiga langkah dasar:

1. Melisis (merusak/membuka) sel.  
Membran sel dapat dirusak dengan salah satu metode berikut: menggunakan panas untuk meningkatkan fluiditas, dithiothreitol (DTT) untuk mengurangi ikatan disulfida, atau deterjen, seperti sodium dodecyl sulfate (SDS), untuk merusak membran.
2. Memisahkan DNA dari komponen sel lainnya.  
Protein, termasuk nukleases, akan tidak aktif oleh denaturasi panas atau oleh enzim protease, termasuk proteinase K, untuk memotongnya. Suhu harus dijaga di bawah 60° C dan harus dipanaskan dalam waktu yang cukup singkat (15 sampai 20 menit) agar DNA dengan berat molekul tinggi tidak terdegradasi.
3. Pemurnian DNA.  
DNA dapat dipisahkan dari komponen pengotor dengan menggunakan magnesium yang dibutuhkan untuk aktivitas nuklease atau DNA diimobilisasi pada fasa padat dan dilusi dengan buffer penyangga / garam. Jika DNA berada dalam fase cair, maka zat ini dipisahkan dari bahan seluler lainnya termasuk protein dan lipid dengan cara menyentrifugasi yang menyebabkan pengotornya mengendap ke dasar tabung atau memisahkannya dengan pelarut organik.

## Metode

### A. Alat

1. Mesin sentrifugasi dengan rotor untuk tabung 1.5ml.
2. Hotplate
3. Freezer -20°C
4. Mikropipet ukuran 1-10ul

5. Mikropipet ukuran 10-100ul
6. Mikropipet ukuran 100-1000ul
7. Heater
8. Vortex
9. Water Bath
10. Timbangan
11. Mortar
12. Heatblock
13. Pisau silet
14. Jarum ose

B. Bahan

1. Kultur bakteri
2. Filet ikan
3. Daun Padi
4. Lysis buffer
5. Chelex-100 resin
6. Tabung ukuran 1.5ml.
7. Mikrotips ukuran 1-10ul
8. Mikrotips ukuran 10-100ul
9. Mikrotips ukuran 100-1000ul
10. Etanol 96%
11. Etanol 70%
12. Isopropanol
13. Kloroform
14. Proteinase K
15. Buffer TE
16. Buffer Longmire
17. Sarung tangan lateks
18. Plastik limbah

C. Cara kerja

1) **Metode Boiling**

- Tabung ukuran 1.5 ml diisi dengan *nuclease free water* (NFW) sebanyak 600uL.
- Kultur bakteri dicuplik sebanyak satu koloni dengan *loop* steril dan dipindahkan ke dalam tabung ukuran 1,5 mL yang sudah berisi 600  $\mu$ L NFW.
- Campuran kemudian divorteks, untuk mendapatkan suspensi keruh sel bakteri dan melisiskan sel.
- Tabung ukuran 1,5 mL dipanaskan di dalam air mendidih dengan suhu 100°C selama 10 menit.
- Tabung ukuran 1,5 mL didinginkan di dalam wadah berisi es batu selama 5 menit.
- Tabung ukuran 1,5 mL disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm.
- Supernatan sebanyak 50uL pada tabung ukuran 1,5 mL dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung ukuran 1,5 mL baru yang berisi 50uL TE buffer. Selanjutnya, dapat disimpan di dalam freezer pada suhu -20°C sampai nanti digunakan untuk tahap selanjutnya.

## 2) Metode Salting-out (Sel bakteri atau sel hewan)

- Sampel koloni bakteri pada medium agar diambil menggunakan ose dan dimasukkan ke tabung sentrifus 2 mL berisi 600 uL dapar Longmire.
- Sampel filet ikan dipotong menjadi berukuran kecil sebesar  $\pm 2 \text{ mm}^3$  dengan menggunakan silet dan ditambahkan buffer longmire sebanyak 600 uL pada microtube.
- Campuran kemudian divorteks selama 10 detik.
- Sebanyak 20 uL proteinase K ditambahkan ke masing-masing sampel.
- Sampel kemudian diinkubasi pada suhu  $56^\circ\text{C}$  selama 30 menit, dan divortex setiap 10 menit sekali selama 10 detik.
- Sampel diinkubasi pada suhu  $65^\circ\text{C}$  selama 30 menit, dan divortex setiap 10 menit sekali selama 10 detik.
- Sampel yang telah diinkubasi didiamkan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 10 menit.
- Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.
- Supernatan dipindahkan ke tabung sentrifus 2 mL baru berisi 600 uL isopropanol dingin, sampel digoyang manual membentuk angka 8.
- Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
- Supernatan dibuang, kemudian pellet diberi 600 uL etanol 70% dingin.
- Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
- Supernatan dibuang dan pellet dikeringkan pada suhu ruang atau dengan heatlock hingga tidak ada alkohol yang tersisa.
- Pellet direhidrasi dengan 50 uL TE buffer.
- Isolat kemudian disimpan di dalam pendingin pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

## 3) Metode Chelex

- Sampel filet ikan dipotong menjadi berukuran kecil sebesar  $\pm 2 \text{ mm}^3$  dengan menggunakan silet.
- Sampel dimasukan ke dalam tabung sentrifus berisi 200 $\mu\text{L}$  larutan Chelex 10%. Chelex 10% dibuat dengan 10 g Chelex yang dilarutkan dengan 100 uL ultrapure water.
- Tabung sentrifus diinkubasi pada suhu  $60^\circ\text{C}$  selama 20 menit dan  $103^\circ\text{C}$  selama 25 menit. Tabung sentrifus divortex setiap 5 menit selama proses inkubasi berlangsung.
- Tabung sentrifus kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit.
- Supernatan kemudian diambil tanpa sedimen resin Chelex dan ditambahkan ke tabung dengan TE buffer dengan rasio v/v 1:1. Tabung kemudian disimpan di  $-20^\circ\text{C}$  sampai digunakan untuk analisis selanjutnya.

## 4) Metode CTAB

- Daun sebanyak 0,1 gram ditimbang, buffer CTAB dipanaskan di waterbath
- Sampel daun digiling dengan 500 $\mu\text{l}$  buffer CTAB (100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol dan 2% PVP)
- Sampel ditransfer ke 1.5 ml microtube (mikropipet diatur ke 450  $\mu\text{l}$ )
- Suspensi diinkubasi pada suhu  $65^\circ\text{C}$  selama 30 menit
- Didinginkan sampai temperatur ruangan
- Kloroform 1 tetes ditambahkan
- Suspensi divortex agar seluruhnya tercampur rata
- Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit

- Aqueous phase ditransfer ke tabung baru (mikropipet diatur ke 50 atau 100  $\mu$ l)
- Isopropanol 1x sampel ditambahkan untuk presipitasi DNA
- Suspensi digoyang-goyangkan membentuk angka delapan untuk melihat endapan DNA
- Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit
- Supernatan dibuang agar tersisa pellet
- Pellet dielusi dengan etanol 70% sebanyak 2x volume sampel
- Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit
- Pellet dikeringkan (air dried) pada suhu 65°C sampai etanol menguap
- Pellet dilarutkan dengan TE Buffer pH 8.0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA)
- Disimpan di suhu -20°C

**LEMBAR LATIHAN**

**Nama** :  
**NIM** :  
**Tanggal** :  
**Kelompok** :  
**Dosen Pengampu** :

**A. PERTANYAAN PEMAHAMAN**

1. Mengapa metode isolasi DNA dari sel bakteri, hewan, dan tumbuhan memerlukan prosedur yang berbeda?

*Petunjuk: Perhatikan perbedaan dalam struktur sel dan komponen yang harus dihancurkan.*

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

2. Apa peran dinding sel dalam isolasi DNA dari tumbuhan dan bakteri, dan mengapa sel hewan tidak memerlukan langkah tambahan untuk menghancurkan dinding sel?

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

3. Jelaskan bagaimana Anda dapat mendeteksi kontaminasi RNA dalam sampel DNA yang telah diisolasi. Bagaimana cara menghilangkan kontaminasi tersebut?

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

4. Mengapa RNase ditambahkan dalam isolasi DNA, dan mengapa tidak digunakan dalam isolasi RNA?

*Petunjuk: Perhatikan peran RNase dan bagaimana ia memengaruhi hasil isolasi DNA dan RNA.*

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

5. Bagaimana penggunaan etanol dalam proses presipitasi DNA berfungsi? Mengapa etanol sering digunakan dalam isolasi DNA?

*Petunjuk: Diskusikan sifat DNA dan pengendapan oleh etanol.*

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

**B. Analisis Hasil Praktikum**

Bandingkan Hasil DNA dari Bakteri, Hewan, dan Tumbuhan setelah praktikum isolasi DNA, Anda mendapatkan hasil kuantifikasi sebagai berikut:

DNA Bakteri:

- Konsentrasi: 200 ng/μL
- Rasio A260/A280: 1,6

DNA Hewan:

- Konsentrasi: 500 ng/μL
- Rasio A260/A280: 1,8

DNA Tumbuhan:

- Konsentrasi: 100 ng/μL
- Rasio A260/A280: 1,4

**PERTANYAAN ANALISIS:**

1. Berdasarkan data di atas, sampel mana yang memiliki kualitas DNA terbaik? Jelaskan alasan Anda.

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

2. Sampel mana yang mungkin terkontaminasi dengan protein atau bahan organik lainnya berdasarkan rasio A260/A280? Bagaimana cara meningkatkan kualitas sampel ini dalam prosedur isolasi?

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

3. Apa yang menyebabkan perbedaan konsentrasi DNA dari sel bakteri, hewan, dan tumbuhan? Pertimbangkan struktur sel, komposisi genom, dan efisiensi lisis dalam jawaban Anda.

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

4. Rasio A260/A280 untuk sampel DNA tumbuhan di bawah 1,5. Apa kemungkinan penyebabnya dan bagaimana memperbaikinya untuk mendapatkan kualitas DNA yang lebih baik?

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

### C. STUDI KASUS

Seorang mahasiswa melakukan isolasi DNA dari daun tanaman jagung menggunakan metode lisis sel dengan buffer CTAB. Setelah kuantifikasi, ia mendapatkan konsentrasi DNA sebesar 150 ng/ $\mu$ L dengan rasio A260/A280 1,3. Mahasiswa tersebut juga melihat ada sedikit warna hijau dalam larutan DNA.

1. Apa penyebab kemungkinan adanya warna hijau dalam sampel DNA? Apakah hal ini mempengaruhi hasil isolasi? Jelaskan.

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

2. Bagaimana mahasiswa ini dapat meningkatkan kualitas DNA tumbuhan yang diisolasi?

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

### D. TANTANGAN EKSPERIMEN

1. Bagaimana Anda akan menyesuaikan metode isolasi DNA jika sampel yang digunakan sangat sedikit, misalnya jaringan mikro (kurang dari 1 mg)?

*Petunjuk: Pertimbangkan volume reagen, pengendapan, dan metode penanganan sampel.*

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



2. DNA yang terkontaminasi dengan protein atau polisakarida dapat mempengaruhi aplikasi selanjutnya seperti PCR. Bagaimana cara Anda memastikan DNA yang diisolasi bebas dari kontaminan ini? Jelaskan langkah-langkah tambahan yang dapat dilakukan.

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

**E. REFLEKSI PRIBADI**

1. Apa tantangan terbesar yang Anda hadapi selama proses isolasi DNA dari sel bakteri, hewan, atau tumbuhan?

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

2. Setelah melakukan isolasi DNA dari tiga jenis sel yang berbeda, bagaimana Anda menilai kesulitan masing-masing proses? Jelaskan sel mana yang menurut Anda paling sulit diisolasi DNA-nya, dan mengapa.

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

3. Jika Anda melakukan eksperimen ini lagi, apa yang akan Anda lakukan berbeda untuk meningkatkan hasil isolasi DNA?

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

**PENILAIAN:**

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