

ISOLASI DNA GENOM PADA DARAH

Laurencius Sihotang

I. Tujuan

- Mempelajari prinsip dan teknik isolasi genom darah
- Mampu melakukan teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
- Mampu memahami teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi genom darah

II. Kajian Pustaka

DNA (*Deoxyribonukleic acid*) merupakan asam nukleat pembawa genetika dalam kehidupan. Informasi genetik terletak di dalam inti sel dan tersusun rapi membentuk kromosom. Para DNA penyusun kromosom inilah yang menentukan karakteristik sifat/jenis rambut, warna kulit dan sifat-sifat khusus yang berbeda antara satu individu dengan lainnya. Perbedaan DNA yang dimiliki oleh seseorang inilah yang menjadi alasan metode sidik DNA menjadi salah satu alat pembuktian yang cukup akurat saat ini.

Molekul DNA dalam suatu sel dapat diekstraksi atau diisolasi untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Corkill dan Rapley, 2008; Dolphin, 2008). Menurut Surzycki (2000), ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses isolasi DNA antara lain harus menghasilkan DNA tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA; metodenya harus efektif dan bisa dilakukan untuk semua spesies metode yang dilakukan tidak boleh mengubah struktur dan fungsi molekul DNA; dan metodenya harus sederhana dan cepat.

Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel (Holme dan Hazel, 1998). Tahap penghancuran sel atau jaringan memiliki beberapa cara yakni dengan cara fisik seperti menggerus sampel dengan menggunakan mortar dan pestle dalam nitrogen cair atau dengan menggunakan metode freezing-thawing dan iradiasi

(Giacomazzi et al., 2005). Cara lain yakni dengan menggunakan kimiawi maupun enzimatik. Penghancuran dengan menggunakan kimiawi seperti penggunaan detergen yang dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel (Surzycki, 2000). Sementara cara enzimatik seperti menggunakan proteinase K seperti untuk melisiskan membran pada sel darah (Khosravinia et al., 2007) serta mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel (Brown, 2010; Surzycki (2000).

III. Alat dan Bahan

Alat:

Tabung falcon, mikropipet, tips, rak tabung mikro, sentrifugasi mikro, lemari es dan termometer

Bahan:

Sampel sumber DNA: Darah, aquades, deterjen cair, nanas, alkohol dingin 95%.

IV. Cara Kerja

Ekstraksi DNA dari Darah

Proses ekstraksi DNA menggunakan prosedur ekstraksi DNA *whole blood* sesuai protocol Kit Promega dengan memodifikasi sebagai berikut:

Sampel darah yang diambil dari 18 orang masing-masing sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disimpan dalam lemari pendingin. Proses ekstraksi DNA menggunakan prosedur ekstraksi DNA *whole blood* sesuai protokol Kit Promega yang dimodifikasi.

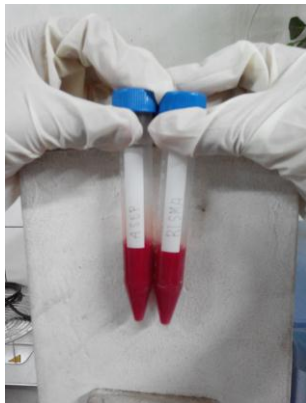
Darah sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung falcon yang baru, kemudian tambahkan larutan PBS (*Phosfat Buffer Saline*) ke dalam tabung falcon sebanyak 3 ml (3000 μ L) lalu dikocok dan di inkubasi selama 7 menit lalu disentrifuse selama 7 menit kemudian perlakuan ini diulangi sebanyak 3 kali. Setelah itu supernatant dibuang dan apabila pada larutan masih terdapat darah maka masukkan *Cell Lysis Solution* (CLS) untuk melisis sel darah tersebut. Larutan yang telah berisi CLS disentrifuse selama 30 detik pada suhu kamar yaitu 27°C dengan kecepatan 13000 – 16000 rpm sampai sel darah putih tersuspensi. Setelah itu, tambahkan larutan Nuclei Lysis Solution pada larutan sebanyak 300 μ L untuk melisis sel darah putih sampai terlihat sangat kental. Kemudian RNase Solution sebanyak 1,5 μ L ditambahkan ke larutan dan dibolak-balik sebanyak 2-5 kali, larutan diinkubasi pada suhu 37°C

selama 15 menit sampai muncul endapan dan dinginkan pada suhu ruang. Protein Precipitation Solution ditambahkan pada larutan sebanyak 100 μ L dan vortek selama 20 detik maka akan muncul gumpalan kecil protein setelah divortex. Larutan akan disentrifuse lagi pada kecepatan 13000 – 16000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang dan akan terlihat protein pellet yang berwarna cokelat gelap. Kemudian supernatan akan dipindahkan ke tabung mikro yang baru sebanyak 200 μ L dan isopropanol dimasukkan sebanyak 300 μ L. Larutan digoyang-goyang sampai masa benang putih yang merupakan strand DNA terlihat dan larutan disentrifuse selama 2 menit pada kecepatan 13000 – 16000 rpm.

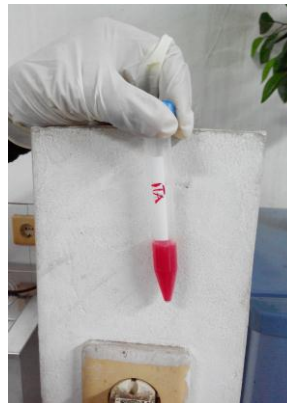
Supernatan dibuang dan menambahkan etanol 70% sebanyak 600 μ L dan disentrifuse selama 2 menit. Supernatan dibuang dengan sangat hati-hati dan sisa etanol dikeringkan. Setelah kering, DNA rehydration Solution atau TE ditambahkan sebanyak 100 μ L pada tabung kering yang berisi DNA lalu disentil-sentil secukupnya supaya keadaan DNA lebih stabil. Agar DNA tidak rusak sebelum dilakukan PCR maka akan disimpan pada suhu 2-8°C.

V. LEMBAR PENGAMATAN

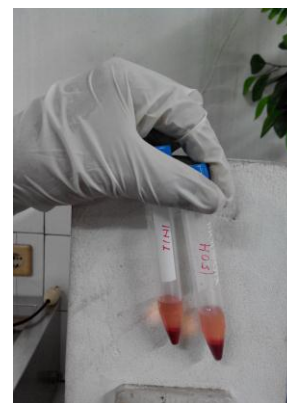
Berikut ini adalah hasil isolasi genom dari darah yang sudah dilakukan:



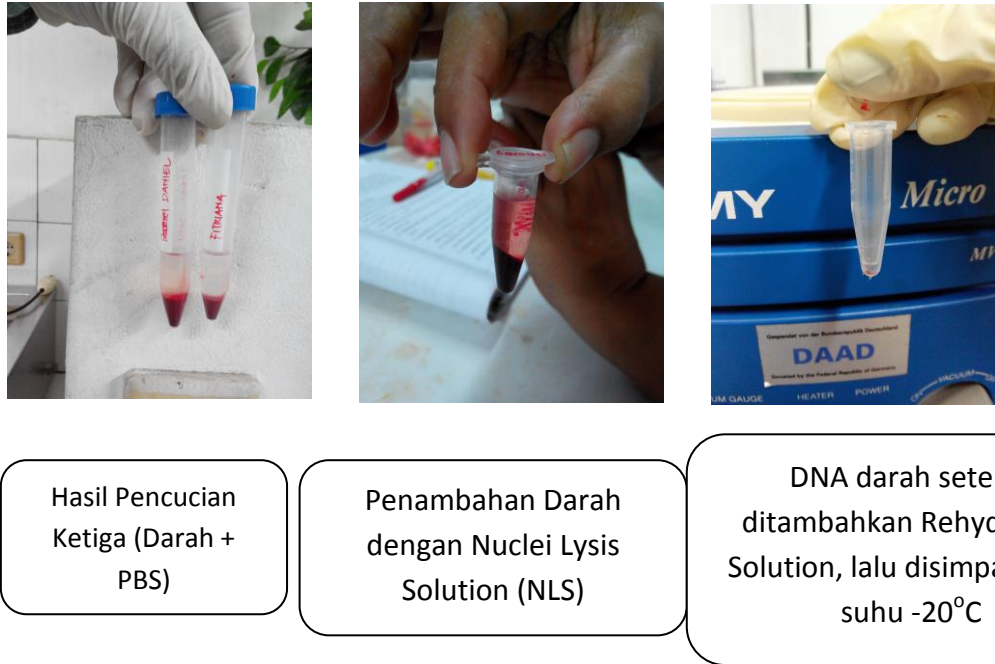
Darah + PBS



Hasil Pencucian pertama (Darah + PBS)



Hasil Pencucian Kedua (Darah + PBS)



Hasil Pencucian
Ketiga (Darah +
PBS)

Penambahan Darah
dengan Nuclei Lysis
Solution (NLS)

DNA darah setelah
ditambahkan Rehydration
Solution, lalu disimpan pada
suhu -20°C

Gambar 1. Proses dan Hasil Pencucian Darah Menggunakan Phosfat Buffer Saline (PBS)

BOTOL	Nama	BOTOL	Nama
Botol 1	Sarah 1	Botol 10	Risma
Botol 2	Sarah II	Botol 11	Asep (Risma)
Botol 3	Fauzhe	Botol 12	Siti
Botol 4	Helen (Pak Laurent)	Botol 13	Rosalin (ester)
Botol 5	Hertina (Pak Laurent)	Botol 14	Daniel (Pak Leo)
Botol 6	Bu isoh	Botol 15	Fitri (Pak Leo)
Botol 7	Tini (Bu isoh)	Botol 16	Samuel (Bu destri)
Botol 8	Bu Arum	Botol 17	Arina (Bu Destri)
Botol 9	Zuni (Bu arum)		

Tabel 1. Data penyimpanan genom darah

VI. PEMBAHASAN

Sampel darah yang tersedia ada 18 sampel, ada dua sampel darah yang tidak berhasil di isolasi genomnya yaitu sampel milik Ibu Siti dan Ibu Ester. Akan tetapi hasil yang diperoleh berjumlah 17 sampel genom dimana sampel nomor 1 dan 2 adalah dari orang yang sama, inilah yang membuat jumlah sampel 17 walaupun dua sampel darah tidak dapat di isolasi genomnya. Proses isolasi genom darah dilakukan dengan protocol Kit Promega dengan memodifikasi, seperti cara kerja diatas.

Penyebab gagalnya isolasi genom tersebut kemungkinan besar dikarenakan sampel darah tersebut sudah lisis. Penyebab lisisnya darah kemungkinan terlalu lama berada diluar mesin pendingin atau mengalami guncangan saat penyimpanan. Walaupun darah sudah berada dalam tabung yang berisi antikoagulan (EDTA) jika disimpan dalam suhu kurang atau lebih dari -4°C darah akan mengalami lisis. Selain itu darah juga bisa lisis akibat guncangan yang berlebih pada tabung EDTA, sehingga sel pecah.

Sel darah yang memiliki inti hanyalah sel darah putih, jadi untuk pengisolasian genom berfokus pada sel darah putih. Proses isolasi genom ini menggunakan PBS sebagai pencuci, sehingga endapan sel darah akan didapatkan. Setelah melalui pencucian 3 kali, supernatant dibuang dan tersisa hanya sel darah. Kedalam tabung ditambahkan *Cell Lysis Solution* (CLS) untuk menghancurkan sel darah. Setelah itu dimasukkan *Nuclei Lysis Solution* (NLS) untuk memecahkan inti sel darah putih sehingga genom akan terlepas keluar. Untuk menghancurkan atau mendegradasi protein di dalam darah digunakan larutan protein precipitation solution sampai terlihat protein pellet yang berwarna coklat. Selain itu bahan lain yang digunakan untuk isolasi DNA darah yaitu isopropanol yang berfungsi untuk melepas DNA dari supernatant. Dan untuk mendapatkan hasil isolasi DNA darah yang murni maka ditambahkan larutan DNA *Dehydration Solution* yang berfungsi untuk memperjelas atau mengikat DNA serta membuat DNA dalam keadaan stabil. Setelah selesai melalui proses seperti langkah kerja diatas, sampel DNA yang sudah diperoleh akan di elektroforesis dan PCR. Akan tetapi karena tidak langsung dilakukan elektroforesis disimpan di lemari pendingin dengan suhu yang sesuai.

VII. KESIMPULAN

Dari 18 sampel darah yang mau di isolasi genomnya hanya berhasil mengisolasi genom 16 sampel, kemungkinannya karena dua sampel darah yang sudah mengalami lisis sehingga tidak dapat di isolasi genomnya.

Daftar Acuan

- Brown, S.M., Hay, J.G., Ostrer, H. 2009. Essentials of Medical Genomics. Second ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA.
- Campbell, A. N. J. B. Reece & L. G. Michell. 2012. Biologi. Edisi 8 jilid 1. terj. Erlangga. Jakarta
- Cohn Robert m., Roth Karl s. 1996. Biochemistry and Disease. William and Wilkins, Inc. Maryland
- Jamilah. 2005. Pengaruh pemberian macam deterjen, penambahan enzim dan ekstrak nanasterhadap hasil isolasi DNA berbagai macam buah. Universitas Negeri malang. Malang
- McPherson, M.J., Moller, S.G. 2006. PCR. Second ed. Taylor & Francis Group. Madison Avenue, NY, US.
- Theophilus, B.D.M. 2008. Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. In: Molecular Biomethods Handbook Second Edition. Ed: Walker, J.M., Rapley, R. Humana Press, NJ, USA.