

Pengembangan Teknik Isolasi DNA Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial

Evy Yulianti

Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY

ABSTRAK

Materi isolasi DNA penting untuk pemahaman mengenai struktur sel dan DNA itu sendiri. Selama ini praktikum isolasi DNA dalam proses pembelajaran atau perkuliahan masih sulit dilakukan karena berbagai keterbatasan, seperti tidak adanya peralatan yang memadai, mahalnya bahan-bahan yang diperlukan dan relatif lamanya waktu yang diperlukan untuk isolasi. Untuk itu perlu adanya pengembangan teknik isolasi DNA yang mudah, murah dan cepat untuk mengatasi masalah tersebut.

Beberapa teknik isolasi DNA sederhana telah berkembang di internet. Teknik ini pada dasarnya menggunakan detergen komersial untuk menggantikan detergen yang biasa digunakan untuk isolasi. Dibandingkan dengan langkah-langkah yang biasa digunakan pada metode standar, ada beberapa perbedaan yang dapat menyebabkan kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh berkurang.

Jika pada penggunaan metode isolasi DNA sederhana terdapat kemungkinan pengurangan kualitas dan kuantitas DNA, maka diharapkan metode baru hasil pengkajian ini dapat mengurangi resiko tersebut, sehingga alternatif pengembangan teknik isolasi DNA yang mudah, murah dan cepat ini dapat diterapkan.

Kata kunci : teknik isolasi DNA, detergen

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Biologi Sel dan Molekuler merupakan bidang ilmu yang terus menerus berkembang. Ilmu ini bermanfaat hampir di semua bidang. Baik dalam bidang medis untuk menangani kelainan-kelainan genetik dan penemuan obat-obat baru, pada bidang pertanian, peternakan, kehutanan untuk meningkatkan produk-produk baik tanaman maupun hewan unggul maupun di bidang lingkungan dalam hal mengatasi polutan serta perannya dalam kemajuan produksi pangan.

Isolasi DNA merupakan teknik yang penting dalam pengembangan ilmu ini. Derajat kemurnian dan kualitas dalam isolasi DNA sangat mempengaruhi hasil yang

akan diperoleh. Secara umum, prosedur ekstraksi yang baik untuk isolasi DNA mencakup tiga hal penting, yaitu harus bisa dihasilkan DNA dengan kemurnian yang tinggi, DNANYa harus utuh, dan jumlahnya mencukupi (konsentrasi tinggi) (Clark, 1997).

Isolasi DNA juga merupakan langkah pertama dalam studi sekuen DNA dari populasi DNA kompleks dan dalam analisis struktur genom dan ekspresi gen. Kuantitas, kualitas dan integritas DNA akan mempengaruhi hasil yang diperoleh secara langsung (Surzycki,2000).

Dengan meningkatnya kebutuhan teknik DNA rekombinan dalam penelitian tumbuhan, metode yang digunakan dalam isolasi DNA menjadi perhatian utama. Metode yang biasa digunakan saat ini merupakan metode yang membutuhkan biaya dan peralatan yang sangat mahal, sehingga di tingkat perguruan tinggi lebih banyak diberikan sebatas teori saja, mahasiswa tidak diberikan pengalaman secara langsung melalui praktikum., hal ini menyebabkan penelitian di bidang ini belum banyak berkembang.

Dengan adanya teknik isolasi DNA yang lebih murah, mudah dan cepat, seorang dosen diharapkan dapat memberikan bekal ketrampilan kepada mahasiswa mengenai suatu teknik dasar yang dapat digunakan untuk mengembangkan sumber daya hayati negara kita yang sangat kaya, agar mahasiswa tersebut dapat mulai berpikir obyektif dan benar dalam mengembangkan teknologi, sehingga penelitian di bidang ini dapat berkembang.

Permasalahan

Biologi Sel dan Molekuler merupakan salah satu ilmu yang memegang peranan penting dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Namun masih banyak hambatan dalam mempelajari ilmu ini. Beberapa diantaranya adalah adanya ketakutan bahwa mempelajari ilmu ini sangat sulit dan membutuhkan biaya yang cukup besar, sehingga ilmu ini banyak diberikan secara abstrak sebatas teori saja, tidak dengan praktikum. Selain itu, terbatasnya peralatan di laboratorium juga

menghambat dilakukannya praktikum. Hal itu dapat menyebabkan kurangnya keinginan mahasiswa dalam mengembangkan ilmu ini melalui penelitian-penelitian.

Urgensi Masalah

Tulisan ini diharapkan dapat membantu para dosen memberikan praktikum biologi sel dan molekuler di dalam kelas. Dengan diberikannya praktikum ini diharapkan dapat menarik minat para mahasiswa karena mahasiswa akan lebih mudah dalam memahami materi ini, sebab biologi sel dan molekuler merupakan ilmu yang sangat kompleks dan sulit untuk para mahasiswa, selain itu juga sangat mahal untuk diimplementasikan. Dengan adanya praktikum mahasiswa akan dapat mengetahui secara langsung pekerjaan yang harus dilakukan dalam penelitian di bidang biologi sel dan molekuler

Dengan adanya tulisan ini diharapkan dosen dapat mengajarkan kepada mahasiswanya ilmu tentang prosedur bekerja di laboratorium, yaitu ketepatan dan ketelitian, dapat menggunakan pengetahuan kimianya di dalam memahami proses isolasi DNA dari bagian sel yang lain, dapat mengaplikasikan pengetahuan tentang struktur sel untuk memahami proses isolasi DNA, dan memperluas pengetahuan tentang struktur sel dan organela yang terdapat di dalam sel serta DNA itu sendiri, terutama sifat-sifat DNA.

PEMBAHASAN

Dengan meningkatnya kebutuhan teknik DNA rekombinan dalam penelitian tumbuhan, metode yang digunakan dalam isolasi DNA menjadi perhatian utama. Langkah pertama yang dilakukan dalam isolasi DNA adalah membuka jaringan dari bahan yang akan diisolasi. Bahan yang akan digunakan sebagai contoh pada makalah ini adalah tumbuhan, oleh karena itu teknik yang digunakan harus cukup kuat dalam membuka sel, karena adanya dinding sel, tetapi tidak sampai merusak isi sel, apalagi sampai memotong DNA. Bahan yang digunakan sebaiknya dari bahan yang segar, karena bahan yang sudah terlalu lama dan tidak segera diisolasi akan mengandung

DNA yang sudah terdegradasi dan dapat juga terkontaminasi dengan DNA eksogen, misalnya oleh DNA bakteri (Hoelzel, 1998).

Preparasi DNA yang panjang dan murni merupakan sesuatu yang sangat diharapkan. Tekanan yang dibutuhkan untuk membuka dinding sel juga dapat memotong DNA, sehingga diperlukan tindakan yang harus sungguh-sungguh menjaga DNA yang dihasilkan dan panjangnya. Nukleus yang utuh merupakan sumber yang baik untuk DNA tumbuhan yang panjang, nucleus tersebut bisa sulit untuk diisolasi dalam jumlah yang banyak, dan teknik yang dibutuhkan sangat sulit. Polisakarida dan tannin merupakan masalah utama dalam tumbuhan karena mereka sulit dipisahkan dari DNA (Murray and Thompson, 1980).

Secara umum prosedur ekstraksi untuk isolasi DNA harus memenuhi tiga kriteria utama:

1. Harus bisa menghasilkan DNA yang murni, untuk penggunaan selanjutnya. Misalnya untuk analisa RFLP, harus digunakan DNA yang cukup murni untuk bisa dipotong oleh *restriction endonuclease* dan ditransfer ke membrane untuk analisis *Southern*. Untuk analisis *polymerase chain reaction* (PCR) ekstrak DNA harus tidak mengandung kontaminan DNA yang dapat mengganggu PCR.
2. DNA harus utuh untuk memberikan pola migrasi yang akurat pada *gel electrophoresis*.
3. DNA yang dihasilkan harus mencukupi.
4. Prosedur yang digunakan harus cepat, sederhana dan murah, dan jika memungkinkan bisa dihindari penggunaan bahan kimia yang berbahaya (Clark, 1997).

Meskipun banyak metode yang dapat digunakan untuk isolasi DNA, tetapi pada dasarnya, isolasi DNA membutuhkan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Perlakuan untuk membuka sel dan melepaskan DNA
2. Metode untuk menghilangkan atau menonaktifkan enzim yang dapat mendegradasi DNA

3. Dan perlakuan yang dapat memisahkan DNA dari protein dan molekul kontaminan yang lain (Guilfoile, 2002).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Bahl and Pfenninger, 1996, menunjukkan bahwa DNA dengan berat molekul yang tinggi dapat dihasilkan dari beberapa jaringan menggunakan detergen dari berbagai merk. Tidak ada perbedaan yang signifikan pada kualitasnya dan hasil isolasi DNA yang diperoleh dapat dideteksi dengan metode lain dan DNA yang diperoleh dapat digunakan sebagai cetakan untuk reaksi PCR. Konsentrasi detergen yang direkomendasikan adalah 100 µl detergen cair ditambah dengan 1,5 akuades. Bubuk sabun cuci yang dijual di pasaran biasanya mengandung campuran detergen, (untuk menghilangkan bahan-bahan organik), enzim (misalnya protease dan lipase), dan kompleks penkhelet (misalnya EDTA), seperti kandungan pada buffer yang biasa digunakan pada isolasi DNA (Bahl and Pfenninger, 1996).

Terdapat banyak metoda isolasi DNA sederhana yang sudah dipublikasikan. Beberapa diantaranya adalah :

1. Isolasi DNA strawberi

DNA diekstrak dari sel dengan cara memasukkan 1/3 gelas strawberi, kira-kira 4 buah strawberi ukuran sedang ke dalam mortar dan haluskan strawberi tersebut dengan pestle sampai halus. Jangan terlalu keras karena DNA dapat rusak. Tambahkan 15 ml 10,6% larutan gula dan aduk untuk mencampur. Campuran yang terbentuk akan berwarna merah keruh karena adanya sel yang mengalami lisis.

Saring larutan tersebut ke dalam gelas beaker. Ini akan menghilangkan biji dan debris sel, yang berisi dinding sel, membrane, organela dan protein. Larutan yang dapat melewati penyaring adalah filtrate yang berisi organela, termasuk nucleus dan mitokondria di mana terdapat DNA.

Untuk melisiskan membran dan menonaktifkan DNase, pindahkan 3 ml filtrat ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 3 ml 10% detergen atau larutan garam. Goyangkan tabung reaksi pelan-pelan dan jangan terlalu keras. Detergen ini akan merusak membran organela dan melepaskan DNA ke dalam larutan. DNA ini

kemudian dapat berikatan dengan protein yang secara normal terdapat di dalam sitosol di luar nukleus. Beberapa protein tersebut merupakan enzim yang dapat merusak DNA (DNase). Untuk menonaktifkan enzim-enzim ini inkubasikan campuran sel selama 10 menit pada suhu 65°C. Dinginkan campuran ini ke dalam water bath dingin selama kurang lebih 2-5 menit.

Untuk mengendapkan DNA, lingkungan di sekitar DNA ini harus dirubah. DNA lebih kecil densitasnya dibandingkan dengan bahan-bahan yang lain dalam campuran isi sel ini dan akan terakumulasi di bagian atas campuran sel. Tambahkan 5 ml 95% ethanol ke dalam tabung reaksi secara pelan-pelan. Pekerjaan ini berhasil dengan ditandai adanya dua lapisan yang terlihat karena adanya pigmen warna merah pada strawberi. Lapisan merah merupakan campuran sel dan yang lainnya adalah alkohol.

Lihat pada bagian di tengah-tengah ke dua lapisan tersebut. Setelah satu menit atau dua menit, akan mulai terlihat benang-benang DNA muncul dari lapisan alkohol. Dengan menggunakan pipet aduk larutan tersebut dengan pola melingkar, sehingga DNA dapat tertangkap. Ambil agregat DNA tersebut (Genetic Science Learning Center, 2006).

2. Isolasi DNA bawang

Potong bawang sebanyak kira-kira 5 sendok the atau 20 gram dan masukkan ke dalam mortar. Tambahkan 1 sendok makan pasir dan gerus bawang tersebut selama kurang lebih 3 menit. Buat larutan A, yang terdiri dari 30 ml air hangat ke dalam gelas beaker 100mL. Tambahkan 1 sendok teh detergen dan aduk pelan-pelan sampai rata dengan pengaduk gelas. Tambahkan juga ½ sendok teh garam dan aduk sampai larut. Masukkan bawang yang sudah halus ke dalam larutan A ini. Aduk campuran ini dengan pengaduk selama 5 menit.

Pindahkan larutan ke dalam gelas beaker baru dengan cara menyaring campuran tadi. Usahakan untuk menyaring lebih banyak larutan yang berwarna kuning ini karena larutan inilah yang berisi DNA.

Ukur 99% ethanol atau isopropyl alcohol sebanyak 30 ml, kemudian masukkan secara pelan-pelan ke dalam larutan kuning tersebut, sampai mendapatkan dua lapisan yang terpisah. Masukkan pengaduk gelas ke dalam bagian tengah larutan sampai masuk ke dalam lapisan bawah. Putar batang pengaduk dengan arah yang sama, sehingga terbentuk suatu padatan (endapan) DNA yang akan membentuk suatu benang yang panjang pada batang pengaduk apabila ditarik.

Ketika dua lapisan ini sudah tercampur secara merata (homogen), pegang bagian bawah gelas beaker dan putar batang pengaduknya. Ini akan menyebabkan DNA terperangkap pada batang pengaduk (Galactics, 1998).

3. Isolasi DNA kacang

Ukur kacang sebanyak 100 ml atau $\frac{1}{2}$ cangkir dan masukkan ke dalam blender, tambahkan kira-kira 1 ml atau $\frac{1}{8}$ sendok teh garam dan air dingin dengan volume 2 kali volume kacang atau kurang lebih 200 ml atau 1 cangkir. Hancurkan bahan-bahan ini kurang lebih selama 15 detik.

Blender ini akan memisahkan bagian-bagian sel-sel kacang, sehingga akan diperoleh larutan kacang. Saring larutan kacang ini dan pindahkan ke dalam gelas beaker yang baru. Ukur volume larutan kacang yang diperoleh dan tambahkan detergen cair dengan volume $\frac{1}{6}$ kali volume larutan kacang tersebut (kurang lebih 30 ml atau 2 sendok makan). Aduk sampai merata. Biarkan campuran ini selama 5-10 menit. Detergen ini akan mengikat protein dan lipid yang terdapat pada membran sel. Pindahkan larutan ini ke dalam gelas reaksi kurang lebih sampai $\frac{1}{3}$ bagian. Tambahkan enzim, yaitu pelunak daging (meat tenderizer) dan aduk dengan hati-hati supaya DNA tidak rusak. Jika sulit menemukan pelunak daging, cobalah untuk menggunakan jus nanas, yaitu dengan cara memotong buah nanas segar kemudian menghancurkannya dengan blender, saring dengan 4 lapis saringan sehingga diperoleh kurang lebih 3 ml. selain itu dapat juga digunakan larutan pembersih lensa kontak. DNA yang terdapat di dalam nukleus bergabung, berikatan dan dilindungi oleh protein-protein. Pelunak daging ini digunakan untuk memotong protein dan melepaskannya dari DNA.

Kemudian masukkan alkohol (70-95% isopropil atau etil alkohol) ke dalam tabung reaksi secara hati-hati, sehingga terbentuk dua lapisan pada larutan kacang. Tambahkan alkohol ini sampai volumenya hampir sama dengan volume kacang.

Alkohol mempunyai densitas yang lebih kecil bila dibandingkan dengan air, sehingga alkohol ini akan berada pada bagian atas dua lapisan yang terpisah. Semua debris sel, kotoran dan protein yang kita hilangkan pada dua langkah pertama akan bergerak ke arah bawah, pada bagian yang berair. DNA akan bergerak ke arah lapisan alkohol dari lapisan kacang. Kita dapat menggunakan gelas pengaduk untuk membawa DNA pada lapisan alkohol. Dengan pelan, kita dapat menarik DNA tersebut dengan cara memutar gelas pengaduk (Anonim, 2006).

Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa teknik yang sudah banyak diterapkan. Ekstraksi atau isolasi pada dasarnya adalah pemisahan DNA dari bahan-bahan yang tidak dikehendaki. Selain proses *grinding*, buffer yang digunakan sangat menentukan proses ekstraksi (Komar, 1999).

Pemecahan sel merupakan langkah penting dalam isolasi DNA. Jalan untuk memecah sel bisa dilakukan secara kimia, mekanik atau enzimatik. Prosedur yang paling baik untuk membuka sel adalah secara kimia atau enzimatik untuk mendapatkan DNA yang utuh. Pembukaan sel secara mekanik seperti sonikasi, penggilingan, dan pemberian tekanan tinggi tidak dapat digunakan untuk preparasi DNA, karena dapat memotong DNA menjadi potongan-potongan kecil. Metode yang baik adalah menggunakan detergen (secara kimia) dan/atau secara enzimatik. Detergen dapat melarutkan lemak dalam membran sel, sehingga sel bisa lisis. Selain itu, detergen ini dapat menghambat DNase yang dapat merusak DNA dan dapat mendenaturasi protein, sehingga protein dapat dihilangkan dari larutan. Biasanya sel tumbuhan tidak dapat dirusak hanya dengan menggunakan detergen. Untuk melisis sel dapat diberikan perlakuan dengan enzim, sehingga membran sel dapat berinteraksi dengan detergen. Dinding sel tumbuhan dapat dihilangkan dengan enzim untuk menghilangkan selulosa yang terdapat di dalam dinding sel. Namun penggunaan enzim ini mahal dan memerlukan banyak waktu, sehingga untuk sel

tumbuhan dapat diganti dengan penggerusan dengan menggunakan pestle atau blender. Penggerusan yang dilakukan tidak boleh terlalu kuat, karena dapat memotong DNA (Surzycki, 2000).

Tabel 1. Perbandingan Isolasi DNA menggunakan metode CTAB dengan beberapa contoh metode isolasi DNA menggunakan detergen

Metode CTAB	Detergen1	Detergen 2	Detergen 3
Bahan + detergen CTAB (CTAB + EDTA + NaCl)	Strawberi	Bawang + pasir	Kacang + garam + air dingin
↓	↓	↓	↓
Gerus	Gerus	Gerus	Blender
↓	↓	↓	↓
Inkubasi (55-60)°C	Gula	Air hangat + detergen + garam	Saring
↓	↓	↓	↓
Kloroform	Saring	Saring	Detergen
↓	↓	↓	↓
Setrifuge	Detergen + lart garam	99% EtOH/ isopropil alkohol	Pelunak daging/jus nanas/pembersih lensa
↓	↓		↓
Isopropanol	Inkubasi 65 °C		70-95% isopropil alkohol
↓	↓		
Sentrifuge	Dinginkan		
↓	↓		
Alkohol 70 %	EtOH		
↓			
Sentrifuge			
↓			
FKI			
↓			
Sentrifuge			
↓			
Ammonium asetat			
↓			
EtOH abs dingin			
↓			
Sentrifuge			
↓			
EtOH 70 %			

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA terdapat dalam buffer isolasi yang dapat menjaga struktur DNA selama pemecahan sel dan purifikasi, memfasilitasi isolasi DNA sehingga mudah untuk menghilangkan protein dan RNA, menghambat enzim mendegradasi DNA yang ada di dalam sel dan menjaga perubahan kimiawi molekul DNA oleh komponen-komponen cair dalam sel yang dilepaskan pada saat sel dipecah. Konsentrasi buffer, pH, kekuatan ionik, penambahan penghambat Dnase dan detergen dapat memenuhi semua kebutuhan di atas (Surzycki, 2000).

Komponen buffer yang digunakan untuk ekstraksi DNA dengan metode CTAB adalah:

1. Buffer Tris. Merupakan buffer yang biasa digunakan untuk isolasi DNA karena harganya yang murah dan kapasitasnya sebagai buffer yang baik. pH dari buffer apabila menggunakan Tris adalah antara pH 7,6 dan pH 9, ini adalah pH yang paling efektif untuk senyawa ini. Konsentrasi buffer tergantung dari tipe sel yang digunakan untuk preparasi DNA. Konsentrasi dan pH buffer yang digunakan harus mencukupi untuk menjaga pH di atas pH 5 dan di bawah pH 12 setelah sel dirusak.
2. Penghambat DNase dan detergen. Semua buffer yang digunakan dalam isolasi DNA harus mengandung penghambat DNase. Dua macam penghambat DNase yang digunakan adalah *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) dan detergen. EDTA merupakan Mg^{++} *ion chelator* dan penghambat DNase, karena DNase membutuhkan ion Mg^{++} sebagai aktivator untuk aktivitasnya. Adanya EDTA di dalam buffer menghambat enzim yang aktifitasnya tergantung logam. Selain EDTA, buffer juga harus mengandung detergen, yang berfungsi untuk menghambat DNase dan sebagai senyawa yang membantu pelisisan sel dan denaturasi protein.
3. NaCl. Garam ini dibutuhkan untuk menjaga struktur molekul DNA dan mengurangi jumlah air yang ada pada fase fenol, dan memfasilitasi deproteinisasi. NaCl berfungsi untuk menjaga asam nukleat tetap berada pada

medium isotonik. Konsentrasi garam ini diperlukan untuk menjaga struktur molekul DNA.

4. PVP (*polyvinylpyrrolidone*) yang berfungsi untuk mengurangi efek polifenol, quinon dan tannin (Surzycki, 2000).

Detergen CTAB yang terdapat pada metode CTAB, pada metode yang lain digantikan dengan detergen komersial, misalnya shampo atau sabun. Bahan aktif yang biasanya terdapat pada sabun maupun shampo antara lain adalah: air, ammonium lauryl sulfate atau sodium laureth sulfate, cocamide DEA, cocamidopropyl betaine, glycerin, citric acid [atau citrate], methylparaben, propylparaben, diazolidinyl urea, disodium EDTA, hydranates, fragrance, sodium chloride (Gierer, A. and G. Schramm, 1956)

Di sini EDTA dan sitrat merupakan *chelating agents*. EDTA di sini juga akan mengikat ion logam yang merupakan kofaktor DNase dan protein lain yang dapat mendegradasi DNA. Hydranate akan berikatan dengan protein dan memisahkannya dari DNA dengan kekuatan ionik. Secara bersamaan bahan-bahan ini akan memisahkan protein dari DNA dan melindungi DNA dari kerusakan (Gierer, A. and G. Schramm, 1956).

Melihat bahan-bahan yang terdapat di dalam detergen komersial, maka komposisinya hampir mirip dengan komposisi buffer pada metode CTAB, yaitu terdapat detergen, dalam hal ini adalah ammonium lauryl sulfate atau sodium laureth sulfate yang menggantikan CTAB, disodium EDTA yang menggantikan EDTA dan sodium chloride atau NaCl seperti yang terdapat pada Metode CTAB.

Pada saat dilakukan penggerusan, bahan tanaman yang akan diisolasi DNAnyanya dilarutkan dalam suatu larutan detergen. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari adanya degradasi nukleolitik yang disebabkan karena adanya DNase.

Ketiga contoh di atas tidak melakukan penggerusan di dalam detergen hal itu dapat menyebabkan berkurangnya kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan karena pada saat sel dihancurkan dimungkinkan DNase juga mulai aktif dan dapat menyebabkan DNA terdegradasi.

Oleh sebab itu, sebaiknya pada metode dengan menggunakan detergen komersial kita memasukkan bahan tanaman ke dalam detergen pada saat bahan tersebut dihancurkan. Karena pada saat penghancuran, sel-sel yang lepas akan segera rusak membrannya karena adanya detergen. Dan DNase akan segera dinonaktifkan. Selain waktunya lebih cepat, diharapkan dengan perlakuan seperti ini akan dapat mengurangi tingkat kerusakan DNA.

Penggerusan yang dilakukan sebaiknya menggunakan pastle dingin untuk mengefisienkan lisisnya sel tanpa adanya kejutan temperatur yang dapat merusak DNA. Penggerusan yang dilakukan juga tidak boleh terlalu keras karena dapat merusak DNA.

Jadi di sini, detergen memiliki beberapa peranan, yaitu membantu rusaknya membran pada saat penggerusan atau pada saat bahan diblender, detergen ini juga akan berikatan dengan muatan positif protein kromosomal sehingga DNA akan dilepaskan ke dalam larutan dan EDTA pada detergen akan segera menonaktifkan DNase.

Jika dilihat pada kedua macam detergen tersebut, baik CTAB maupun detergen komersial semuanya mengandung NaCl. Garam ini sangat bermanfaat ketika protein yang terdapat pada membran sel bertemu dengan detergen. Muatan negatif dari DNA secara alami akan berikatan dengan muatan positif dari protein pada membran sel. Ini merupakan salah satu masalah karena tujuan kita adalah mengisolasi DNA. Garam yang ditambahkan ini akan meminimalkan daya ikatan antara DNA dan protein dengan merusak keseimbangan muatan negatif dan positif antara keduanya. Dengan demikian DNA akan lebih mudah dipisahkan (Galactics, 1998).

Garam akan berikatan dengan gugus fosfat DNA yang bermuatan negatif yang dapat membantu DNA mengendap pada saat pemberian ethanol absolute dingin (Dollard, 1994).

Setelah penggerusan dalam detergen, larutan ini kemudian diinkubasi pada air dengan suhu 55-60° C. pada suhu ini protein akan terdenaturasi, namun DNA tidak akan rusak karena DNA kan terdenaturasi pada suhu lebih dari 60°C. selain itu

dengan adanya pemanasan ini akan membantu melunakkan membrane sel dan membantu detergen menyisip diantara membran sehingga membran bisa terurai.

Untuk menghilangkan DNase dan protein-protein yang mengganggu bisa juga digunakan enzim protease yang dalam hal ini digantikan dengan pelunak daging, jus nanas atau papaya, atau pembersih lensa. Namun penggunaan bahan buah-buahan dapat meningkatkan jumlah DNA yang diperoleh karena mendapat tambahan dari bahan buah-buahan tersebut.

Sentrifugasi pada metode CTAB digantikan dengan penyaringan pada metode dengan menggunakan detergen. Penyaringan di sini dapat dilakukan dengan menggunakan kertas saring. Penyaringan ini dilakukan untuk memisahkan larutan yang berisi DNA dengan debris sel.

Setelah diperoleh larutan yang berisi DNA, digunakan ethanol absolut dingin atau isopropanol dingin untuk mengendapkan DNA. DNA akan tampak seperti benang-benang halus yang berwarna putih.

Jadi di sini, urutan pekerjaan isolasi DNA yang dilakukan adalah bahan digerus dalam larutan detergen kemudian diinkubasi pada suhu 55-60° C untuk membantu menghilangkan protein dan DNase, dalam hal ini bisa juga digunakan pengganti enzim protease. Setelah itu dilakukan penyaringan, larutan yang dihasilkan yang berisi DNA ditambah dengan ethanol atau isopropanol dingin untuk mengendapkan DNA yang akan tampak sebagai benang-benang halus.

Di sini terdapat beberapa bahan tambahan yang digunakan dalam proses isolasi, antara lain penggunaan pasir dalam pembukaan sel bawang yang dapat membantu melunakkan membran dan penambahan gula pada saat pelisisan sel strawberi yang dapat menyebabkan larutan menjadi hipertonis sehingga sel lebih mudah lisis.

PENUTUP

Isolasi dapat dilakukan menggunakan metode yang lebih mudah, murah, dan cepat menggunakan detergen komersial, sehingga diharapkan dapat diterapkan sebagai materi praktikum di kelas. Metode ini akan dapat menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi apabila langkah-langkah yang dilakukan tepat dan menggunakan bahan-bahan yang sesuai.

Untuk mendapatkan metode yang benar-benar dapat menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi, sebaiknya dilakukan pengujian mengenai langkah-langkah yang dilakukan, bahan-bahan yang digunakan beserta ukurannya serta eksplan apa yang paling banyak mengandung DNA, sehingga untuk praktikum, DNA yang diperoleh bisa tampak lebih jelas.

Detergen yang digunakan sebaiknya yang mengandung bahan-bahan seperti yang sudah disebutkan dalam pembahasan, misalnya pada shampoo atau sabun cuci.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim.(2006).*Extract DNA from Anything Living*. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari http://sps.k12.ar.us/massengale/extracting_dna.htm
- Bahl & M. Pfenninger. (1996) A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Oxford Journal*. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/24/8/1587> -->
- Clark, M.S. (1997). *Plant Molecular Biologi*. Lab Fox. BIOS Scientific Publisher Limited. UK.
- Galactics. (1998). Isolation of DNA from Onion. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari http://collections.ic.gc.ca/science/english/bio/projects/_genetics.html
- Genetic Science Learning Center. (2006). DNA Extraction from Wheat GermThe University of Utah. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari <http://gslc.genetics.utah.edu/units/activities/wheatgerm/> --
- Gierer, A. and G. Schramm. (1956). Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus. *Nature* 177: 702-703. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari <http://www.science-projects.com/onionDNA.htm>

- Guilfoile, P. (2002). *Biotechnology Topics in the Biology Curriculum*. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari <http://www.actionbioscience.org/education/guilfoile.html> -->
- Dollard, K. (1994), DNA isolation from onion. Diambil pada tanggal 18 Juni 2006, dari <http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/dollardonionDNA.html> -->
- Komar, T.E.(1999). *Petunjuk Teknis Analisa DNA dengan Random Amplified P* Diambil pada tanggal 18 Juni 2006 dari *olymorphic DNA (RAPD)*. Laboratorium Genetika Molekular. Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Hutan. Yogyakarta.
- Murray,M.G., W.F. Thompson. (1980). *Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA*. Carnegie Institution of Washington. Departement of Plant Biology. Stanford.USA.
- Surzycki, S.(2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*, Springer-Verlay, Berlin Heidelberg. Germany.