

**ALTERNATIF PENGGUNAAN SILIKA BENTONIT SEBAGAI PENGGANTI
FENOL-KLOROFORM-ISOAMIL ALKOHOL DALAM EKSTRAKSI DNA
SECARA LANGSUNG DARI TANAH HUTAN MANGROVE**

Khisan Qamariya, Wahyu Dwijani Sulihingtyas, dan I Nengah Wirajana*

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

**E-mail : nwirajana@gmail.com*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang perbandingan ekstraksi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol dan silika bentonit. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan kualitas dan kuantitas DNA metagenomik hasil ekstraksi menggunakan fenol-kloroform-isoamil alkohol dibandingkan dengan silika bentonit setelah mengalami proses lisis secara langsung dari tanah hutan mangrove. Penggunaan fenol-kloroform-isoamil alkohol tidak memenuhi konsep *Green Chemistry*, sehingga dalam penelitian dicoba diganti dengan silika bentonit. DNA metagenomik hasil ekstraksi dari dua teknik ini diuji dengan elektroforesis gel agarosa dan spektrofotometri UV-Vis. Hasil elektroforesis gel agarosa terhadap DNA metagenomik menunjukkan bahwa DNA relatif lebih banyak terkandung pada supernatan pertama dari ekstraksi dengan silika bentonit; namun diperoleh keutuhan DNA yang relatif sama seperti DNA hasil ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol. Hasil analisis dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa rasio $A_{260/230}$ DNA hasil ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol memiliki tingkat kemurnian relatif lebih tinggi terhadap asam humat. Rasio $A_{260/280}$ DNA metagenomik hasil ekstraksi dengan silika bentonit pada elusi terakhir menunjukkan tingkat kemurnian relatif terhadap protein yang tertinggi daripada yang lain.

Kata kunci : tanah mangrove, DNA metagenomik, silika bentonit

ABSTRACT

Research on comparing the metagenomic DNA extraction from mangrove forest soil with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and with silica bentonite was conducted. The purpose of this study was to find the differences in quality and quantity of metagenomic DNA extracted. The silica bentonite was compared to meet the Green Chemistry concept. The metagenomic DNA from these extractions were analyzed by agarose gel electrophoresis and UV-Vis spectrophotometry. The results of electrophoresis showed that metagenomic DNA extracted with silica bentonite were relatively higher in concentration than with phenol-chloroform-isoamyl alcohol; but integrity of their DNA were the same. The results of UV-Vis spectrophotometry analysis showed that $A_{260/230}$ ratio of the phenol-chloroform-isoamyl alcohol extract had higher relative purity level to humic acid. The $A_{260/280}$ ratio of the final elution of the silica bentonite extraction showed the highest relative purity level to protein.

Keywords : Mangrove soil, Metagenomic DNA, silica bentonite

PENDAHULUAN

Kenyataan bahwa sebagian besar mikroorganisme tidak dapat dikulturkan dalam laboratorium menuntut para ahli untuk mempelajari mikroorganisme tanpa kultur,

sehingga terciptalah teknik metagenomik. Metagenomik merupakan analisis yang melibatkan isolasi DNA dari sampel lingkungan, kloning DNA ke dalam vektor yang sesuai, mentransform klon ke dalam bakteri inang dan skrining transforman yang dihasilkan (Handelsman, 2004).

Dua teknik isolasi DNA yang dapat diterapkan dalam metagenomik, adalah isolasi secara langsung dan secara tidak langsung. Isolasi DNA metagenomik secara langsung menghasilkan DNA lebih banyak dibanding isolasi tidak langsung, namun tidak sempurna DNA yang diisolasi secara tidak langsung (Miller *et al.*, 1999). Banyak studi yang mempelajari tentang metode isolasi DNA metagenomik secara langsung untuk mendapatkan DNA dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

Widiartha (2013) telah melakukan isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove dengan menggunakan metode Ikeda *et al.* (2004) dan metode Kuske *et al.* (1997). Hasil isolasi DNA metagenomik yang diperoleh dengan metode Ikeda *et al.* (2004) menunjukkan intensitas pita DNA yang lebih tinggi (tebal) pada elektroforegramnya, sedangkan tingkat kemurnian terhadap asam humat dan proteindari DNA hasil isolasi kedua metode tersebut masih rendah dan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Penggunaan fenol pada tahapan ekstraksi DNA dalam metode Ikeda *et al.* (2004) juga dapat menyumbangkan serapan di panjang gelombang 260 nm, karena fenol memiliki serapan maksimal di panjang gelombang 270 nm (Linacero *et al.*, 1998). Selain dapat menyumbang serapan pada panjang gelombang tersebut, penggunaan fenol-kloroform-isoamilalkohol juga dinilai tidak ramah lingkungan dan tidak memenuhi konsep *Green Chemistry*, yaitu sebuah konsep yang secara giat merancang proses atau produk kimia dengan memperkecil atau bahkan menghilangkan penggunaan maupun pembentukan bahan kimia berbahaya.

Kauffmann *et al.* (2004) dan Rojas-Herrera *et al.* (2008) telah melakukan isolasi DNA tanah dengan metode isolasi langsung, dengan penggunaan *silica-beads* pada tahap pemurnian dan menghasilkan DNA yang relatif murni dari kontaminan. Menurut studi yang dilakukan oleh Eryatma (2013), penggunaan silika bentonit dalam proses pemurnian DNA metagenomik dapat menghasilkan DNA yang relatif murni pada uji spektrofotometri UV-Vis, tetapi konsentrasinya sangat rendah yang tidak terdeteksi dengan teknik elektroforesis.

Pada penelitian ini telah dilakukan perbandingan ekstraksi DNA metagenomik dari

tanah hutan mangrove dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol dan silika bentonit. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan kualitas dan kuantitas DNA metagenomik hasil ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol dan silika bentonit setelah mengalami proses lisis secara langsung dari tanah hutan mangrove. Penggunaan fenol-kloroform-isoamil alkohol tidak memenuhi konsep *Green Chemistry*, sehingga dalam penelitian dicoba diganti dengan silika bentonit. Selain itu, pada tahapan lisis sel dari kedua teknik ini yang menggunakan metode lisis secara langsung, telah dilakukan pembuktian keuntungan penggunaan susu skim pada proses isolasi DNA metagenomik dari tanah, yang memperkuat hasil penelitian sebelumnya dari Ikeda *et al.* (2004) dan Widiartha (2013).

MATERI DAN METODE

Bahan

Tris-Cl, Na₂EDTA.2H₂O, *Sodium Dodecyl Sulphate*, fenol, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, natrium asetat, etanol 95%, agarosa, etidium bromida, basa Tris, asam asetat glasial, dan *loading buffer*. Sampel tanah hutan mangrove yang digunakan berasal dari penelitian sebelumnya (Wirajana *et al.*, 2012).

Peralatan

Botol polietilen steril, neraca analitik, botol semprot, *hot plate*, stirer magnetik, termometer, labu ukur, gelas beaker, *ball filler*, pipet volume, mikro pipet, tip mikro, tabung mikro 1,5 mL, *High Speed Refrigerated Micro Centrifuge TOMY MX-301*, spektrofotometer UVmini-1240 *single beam* merk Shimadzu, dan seperangkat alat elektroforesis horizontal (*Bio Rad*).

Cara Kerja

Isolasi DNA Metagenomik

Suspensi sampel tanah ditambahkan buffer TENS pH 8 (dengan dan tanpa penambahan susu skim berdasarkan Ikeda *et al.*, 2004), divorteks 1 menit, dilakukan proses thermal shock dengan meletakkan tabung pada air mendidih dan air es secara bergantian sebanyak 3 kali selama 5 menit

tiap tahapnya, divorteks selama 1 menit x 2 dan disentrifugasi pada 3000 rpm sampai terbentuk dua lapisan. Hasil ini merupakan hasil dari proses lisis secara langsung dari tanah. Supernatant ditambah fenol : kloroform : isoamil alkohol (25 : 24 : 1) sebanding volume supernatan, disuspensi dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 3000 rpm sampai terbentuk dua lapisan. Supernatan ditambah isopropanol 1 x volume sampel, ditambah Natrium Asetat 0,1 x volume sampel, disuspensi, disimpan pada suhu -20°C selama 1-2 jam, lalu disentrifugasi pada 3000 rpm. Pelet dicuci etanol 95%, pelet DNA disentrifugasi vakum lalu disuspensi dengan 100 μL bufer TE10/0,1 (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0).

Hasil proses lisis yang sama seperti di atas berupa supernatan dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 20 mg silika bentonit, NaCl 0,1 x volume supernatan, diinkubasi selama 30 menit dan divorteks pelan selama inkubasi secara bergantian, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm. Supernatan ditampung, pelet dicuci etanol 70%, pelet DNA disentrifugasi vakum lalu disuspensi dengan 100 μL bufer TE10/0,1 (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0), divorteks pelan, lalu disentrifugasi kembali pada 3000 rpm. Lapisan supernatan yang diperoleh merupakan supernatant DNA. Supernatant yang ditampung pada tahap sebelumnya ditambah etanol 2 x volume, disuspensi, didinginkan pada suhu -20°C selama 1-2 jam, disentrifugasi pada 3000 rpm. Pelet DNA disentrifugasi vakum lalu disuspensi dengan 100 μL bufer TE10/0,1 (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis gel agarosa pada Gambar 1 menunjukkan bahwa DNA metagenomik hasil ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol yang diisolasi dengan dan tanpa menggunakan susu skim pada buffer lisisnya. Hasil tersebut menunjukkan pita yang lebih tebal dengan intensitas yang lebih tinggi yang diperoleh dengan menggunakan susu skim pada buffer lisisnya dibandingkan DNA yang diisolasi tanpa menggunakan susu skim pada buffer lisisnya. Hal ini menunjukkan secara semi

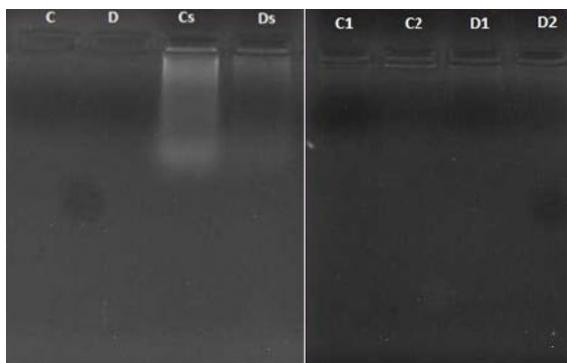
kuantitatif bahwa konsentrasi pita DNA yang nampak lebih tebal relatif lebih tinggi dibandingkan dengan pita DNA yang lebih tipis. Peranan penambahan susu skim sebagai *blocking reagen* telah terbukti, yang mana susu skim dapat menghalangi DNA untuk terserap kembali pada matriks tanah, sehingga DNA yang diperoleh memiliki jumlah dan konsentrasi yang lebih tinggi dari pada DNA hasil isolasi tanpa penggunaan susu skim pada buffer lisisnya. Hasil ini sesuai dengan yang didapatkan oleh Ikeda *et al.* (2004) dan Widiartha (2013). Bentuk pita yang lebar, sedikit berekor dan memiliki jarak migrasi yang tidak jauh dari sumur menandakan bahwa DNA yang dihasilkan merupakan DNA yang relatif utuh dan sedikit terfragmentasi (Sambrook *et al.*, 1989).



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel agarosa DNA metagenomik hasil ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol dengan menggunakan susu skim pada buffer lisisnya (A); dan tanpa penggunaan susu skim pada buffer lisisnya (B)

Supernatan sebelum elusi, baik yang berasal dari hasil lisis menggunakan susu skim pada buffer lisisnya (Cs) atau tidak (Ds), menunjukkan pita yang cukup jelas terlihat pada elektroforegram. Pita DNA Cs memiliki intensitas yang relatif lebih tinggi dari pada pita DNA Ds. Seperti yang telah disampaikan di atas, susu skim sebagai *blocking reagen* menutup akses bagi DNA untuk terserap kembali ke dalam matriks tanah

sehingga diharapkan dapat mengisolasi lebih banyak DNA Ikeda *et al.* (2004). Ditinjau dari pita elektroforegram, DNA yang terkandung dalam supernatan sebelum elusi Cs memiliki konsentrasi yang relatif lebih tinggi dari pada DNA yang terkandung dalam supernatan sebelum elusi Ds. Bentuk pita yang lebar menunjukkan DNA tersebut memiliki jarak migrasi yang bervariasi, serta pita dengan sedikit berekor menandakan DNA yang dihasilkan relatif utuh yang sedikit terfragmentasi.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel agarosa dari DNA metagenomik dengan teknik ekstraksi silika bentonit. C: elusi awal dari silika bentonit yang menggunakan susu skim pada buffer lisisnya (C1: pengulangan elusi pertama, C2: pengulangan elusi kedua, dan Cs: supernatan sebelum elusi); D: elusi awal dari silika bentonit yang tidak penggunaan susu skim pada buffer lisisnya (D1: pengulangan elusi pertama, D2: pengulangan elusi kedua, dan Ds: supernatan sebelum elusi)

Pada Tabel 1 ditunjukkan rasio absorbansi $A_{260/230}$ tertinggi dimiliki oleh DNA A sebesar $0,876 \pm 0,002$; diikuti dengan DNA Cs sebesar $0,870 \pm 0,007$; kemudian Ds sebesar $0,864 \pm 0,004$; dan B sebesar $0,843 \pm 0,001$. Sedangkan rasio absorbansi $A_{260/280}$ tertinggi dimiliki oleh DNA C₂ sebesar $1,616 \pm 0,010$ lalu diikuti dengan DNA C₁ sebesar $1,562 \pm 0,012$

Tabel 1. Perbandingan Rasio $A_{260/230}$ dan $A_{260/280}$ DNA metagenomik hasil isolasi

Sampel	$X_{260/230}$	$X_{260/280}$
A	$0,876 \pm 0,002$	$1,285 \pm 0,002$
B	$0,843 \pm 0,001$	$1,346 \pm 0,004$
C	$0,418 \pm 0,001$	$1,421 \pm 0,002$
C ₁	$0,427 \pm 0,003$	$1,444 \pm 0,006$
C ₂	$0,292 \pm 0,001$	$1,616 \pm 0,010$
C _s	$0,870 \pm 0,007$	$1,288 \pm 0,002$
D	$0,503 \pm 0,001$	$1,418 \pm 0,006$
D ₁	$0,562 \pm 0,001$	$1,464 \pm 0,002$
D ₂	$0,423 \pm 0,005$	$1,562 \pm 0,012$
D _s	$0,864 \pm 0,004$	$1,296 \pm 0,010$

Pita-pita yang terbentuk pada elektroforegram menunjukkan bahwa DNA lebih banyak terkandung pada supernatan sebelum elusi dari silika bentonit dibandingkan dengan hasil elusi awal, pertama dan kedua. DNA A dan Cs memiliki bentuk pita yang lebar serta memiliki intensitas yang relatif paling tinggi jika dibandingkan dengan pita DNA lainnya. Pita yang terbentuk dari DNA sampel A dan Cs tidak berbeda jauh dan dapat dikatakan relatif sama. Jika ditinjau dari kualitas DNA yang dihasilkan, yaitu sedikit terfragmentasi dan relatif utuh dan juga dilihat dari kuantitas yang dihasilkan, ekstraksi dengan silika bentonit (terutama dari supernatan sebelum elusi) dapat digunakan sebagai teknik alternatif dalam mengisolasi DNA metagenomik dari sampel tanah, untuk menggantikan ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol yang masih menggunakan zat berbahaya dan tidak ramah lingkungan. Hasil ini dapat memenuhi salah satu konsep *green chemistry*.

Sedangkan jika ditinjau dari hasil uji dengan elektroforesis UV-Vis menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi masih mengandung kontaminan asam humat yang cukup tinggi, hal ini dibuktikan dengan rasio absorbansi $A_{260/230}$ yang diperoleh masih bernilai di bawah satu. Begitu pula dengan rasio absorbansi $A_{260/280}$ yang diperoleh masih bernilai di bawah range 1,8 – 2,0; yang menandakan bahwa DNA total hasil isolasi masih mengandung kontaminan protein.

Nilai rasio $A_{260/230}$ yang tidak berbeda jauh antara DNA sampe A dan Cs memperkuat kesimpulan yang ditarik dari hasil uji dengan elektroforesis gel agarosa. Kontaminan protein yang terkandung pada DNA hasil isolasi masih cukup tinggi, yang dibuktikan dengan rendahnya nilai rasio $A_{260/280}$ yang diperoleh. Nilai rasio $A_{260/230}$ terendah dimiliki oleh DNA sampel A yaitu $1,285 \pm 0,002$, diikuti dengan DNA sampel Cs sebesar $1,288 \pm 0,002$, dan sampel Ds sebesar $1,296 \pm 0,010$. Karena masih tingginya tingkat kontaminan DNA hasil isolasi terhadap protein, maka diperlukan studi lebih lanjut agar dapat dihasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

SIMPULAN

Kualitas dan kuantitas DNA metagenomik yang diisolasi secara langsung dari tanah hutan mangrove dengan teknik ekstraksi menggunakan silika bentonit (terutama dari supernatan sebelum elusi) dapat digunakan sebagai teknik alternatif untuk menggantikan teknik ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol. Hasil ini dapat memenuhi salah satu konsep *green chemistry* yang menghindari penggunaan zat berbahaya dan tidak ramah lingkungan

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak di Jurusan Kimia Universitas Udayana dan Laboratorium DNA Forensik UPT Forensik Universitas Udayana yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Eryatma, R. A., 2013, Penggunaan Silika Bentonit dalam Pemurnian DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bali
- Handelsman, Jo., 2004, Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68 (4) : 669-674
- Hoshino, Yuko Takada, and Naoyuki Matsumoto, 2004, An Improved DNA Extraction Method Using Skim Milk from Soils that Strongly Adsorb DNA. *Microbes Environ*, 19 (1) : 13-19
- Ikeda, S., Kazuo, N. W., Kiwamu, M., and Nozomi Y., 2004, Evaluation of Soil DNA from Arable Land in Japan Using a Modified Direct-extraction Method, *Microbes Environ*, 19 (4) : 301-309
- Kauffmann, I. M., Schmitt J., and Schmid, R. D., 2004, DNA Isolation from Soil Samples for Cloning in Different Hosts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (5) : 665-670
- Kuske, C. R., Barns, S. M., and Busch, J. D., 1997, Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9) : 3614-3621
- Linacero R, Rueda J, Vazquez AM, 1998, *Quantifying of DNA*. Karp A, Isaac PG, Ingram DS (Eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants And Animals*, Chapman and Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, p. 18-21
- Miller, D.N., Bryant, JE, Madsen, EL., and Ghiorse, WC., 1999, Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples, *Appl Environ Microbiol*, 65 : 4715-4724
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., and Mena-Martínez, M.E., 2008, A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments, *Molecular Biotechnology*, 40 (1) : 13-17

Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA

Widiartha, F. O., 2013, Perbandingan Kualitas DNA Metagenomik Hasil Isolasi dari Tanah Hutan Mangrove dengan Lisis Sel Secara Langsung dan Tidak Langsung dengan Variasi Waktu Thermal Shock, *Skripsi*, Universitas Udayana. Bali