

PENGARUH PENAMBAHAN SUSU SKIM TERHADAP HASIL DNA METAGENOMIK DIISOLASI DARI TANAH HUTAN MANGROVE

Ni Putu Frida Oktaningtias Widiartha, Ketut Ratnayani, dan I Nengah Wirajana*

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbara

*email : nwirajana@gmail.com

ABSTRAK

Lisis sel merupakan tahapan yang amat krusial bagi kualitas maupun kuantitas DNA metagenomik yang diisolasi dari lingkungan. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan kualitas (keutuhan dan kemurnian) DNA metagenomik hasil isolasi dengan menggunakan metode lisis sel secara langsung dari tanah hutan mangrove dengan dan tanpa penambahan susu skim pada bufer lisis. Hasil isolasi DNA total dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis pada λ 230, 260, dan 280 nm; dan dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa dengan penambahan susu skim pada bufer lisis diperoleh intensitas pita DNA yang lebih tinggi (tajam) yang menunjukkan bahwa DNA total yang diperoleh relatif lebih utuh atau sedikit terfragmentasi dibandingkan hasil tanpa penambahan susu skim. Hasil analisis dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan DNA yang diisolasi dengan dan tanpa penambahan susu skim tingkat kemurniannya tidak berbeda nyata terhadap asam humat (rasio $A_{260/230}$). Untuk tingkat kemurnian DNA terhadap protein dilihat dari rasio $A_{260/280}$, menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi tanpa penambahan susu skim memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan hasil isolasi dengan penambahan susu skim.

Kata kunci: susu skim, DNA Metagenomik, lisis, tanah hutan mangrove

ABSTRACT

Cell lysis is the most important step for quality and quantity of metagenomic DNA isolated from an environmental samples. The aim of the research was to compare the quality (integrity and purity) of the metagenomic DNA isolated using the direct cell lysis method from mangrove forest soil with and without skim milk. The total of metagenomic DNA isolated from mangrove forest soil result was analyzed by the spectrophotometric UV-Vis method at λ 230, 260, and 280 nm; and also by using the agarose gel electrophoresis. The results showed that metagenomic DNA can be isolated from mangrove forest soil. The agarose gel electrophoresis results showed that the total DNA quality obtained by the direct cell lysis using buffer lysis with skim milk was relatively less fragmented and the band intensity of DNA was higher compared with direct cell lysis using buffer lysis without skim milk. The results of spectrophotometry indicated that the purity of DNA isolated with and without skim milk was not significantly different against the humic acid (ratio on $A_{260/230}$). As shown by the $A_{260/280}$ ratio, the total DNA isolated without skim milk had higher purity level than with skim milk.

Keywords: skim milk, metagenomics DNA, lysis, mangrove forest soil

PENDAHULUAN

Para ahli memperkirakan bahwa sekitar 99% dari mikroorganisme yang ada di alam saat ini tidak dapat dibudidayakan atau dikultivasi dengan teknik standar (Amann, *et al.*, 1995). Metode

alternatif yang dapat dikembangkan adalah dengan mengisolasi DNA langsung dari mikroorganisme yang hadir dalam tanah tanpa melalui pembuatan kultur sebelumnya yang dikenal dengan istilah metagenomik. Metagenomik diawali dengan isolasi DNA dari sampel lingkungan. Saat ini,

terdapat dua pendekatan untuk isolasi DNA metagenomik, yaitu lisis sel secara langsung dan tidak langsung. Metode lisis secara langsung didasarkan pada ekstraksi langsung DNA dari sampel lingkungan, yaitu dilakukan lisis secara *in situ* (tanpa pemisahan sel-sel bakteri dari sampel lingkungan) dan selanjutnya dilakukan pemurnian DNA. Metode lisis secara tidak langsung diawali dengan pemisahan sel-sel bakteri dari sampel lingkungan (*ex situ*), diikuti dengan lisis suspensi sel, dilanjutkan dengan pemurnian DNA (Urban and Adamczak, 2008).

Yuliana (2012) dan Rosalinda (2012) telah melakukan lisis DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove menggunakan metode lisis sel secara tidak langsung. Hasil analisis DNA metagenomik dengan elektroforesis dan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan hasil DNA metagenomik yang sebagian terfragmentasi, diduga teknik *thermal shock* yang digunakan untuk melisis sel dapat mempengaruhi hasil DNA yang sebagian terfragmentasi. Metode lisis sel secara tidak langsung umumnya dilakukan untuk mendapatkan massa molekul DNA yang lebih besar dan kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan prosedur lisis langsung. Namun dalam banyak kasus, jumlah DNA yang ditemukan jauh lebih rendah. Oleh karena itu, untuk pembuatan pustaka metagenomik yang membutuhkan DNA dengan jumlah yang cukup banyak, seringkali juga DNA diisolasi dari tanah dengan metode lisis sel secara langsung (Torsvik *et al.*, 1989). Lisis sel secara langsung yang umumnya menghasilkan kuantitas DNA yang lebih tinggi, diasumsikan dapat mengakses persentase yang lebih besar dari populasi mikroba. Metode lisis sel secara langsung dilakukan juga untuk mendapatkan DNA dari keragaman genetika yang lebih luas daripada metode tidak langsung (Leff *et al.*, 1995).

Hoshino dan Matsumoto (2005) menambahkan susu skim dan RNA saat ekstraksi DNA untuk meningkatkan hasil DNA dari tanah vulkanik. Susu skim atau RNA ditambahkan sebagai kompetitor adsorpsi. Susu skim dapat meminimalkan degradasi dan adsorpsi asam nukleat ke dalam tanah sedangkan RNA bersaing dengan DNA untuk teradsorpsi pada partikel tanah. Penambahan susu skim dapat menghasilkan intensitas pita yang lebih tinggi dan hemat biaya.

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dilakukan isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove dengan lisis sel secara langsung dan dibandingkan kualitas DNA metagenomik hasil isolasinya dengan dan tanpa penambahan susu skim pada bufer lisis. Hal ini menarik dikaji dalam penelitian ini untuk mempersiapkan bahan DNA yang representatif bagi pembuatan pustaka metagenomik pada penelitian selanjutnya dalam rangka eksplorasi enzim (khususnya selulase) dari tanah hutan mangrove.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan kimia yang digunakan berkualitas pro-analysis (PA), yaitu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Tris-Cl, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), fenol, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, Na-asetat, etanol, agarosa, etidium bromida, basa Tris, *loading bufer* 1x [*loading bufer* 6x : *bromophenol blue* 0,25% (b/v) dan sukrosa 40% (b/v)]. Bahan lain yang digunakan adalah susu skim dan sampel tanah dari hutan mangrove.

Peralatan

Pipet ukur 10 mL, gelas piala (*beaker glass*), gelas ukur, Erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, kuvet, batang pengaduk, plastik polietilen, botol semprot, bola hisap, *hot plate*, spatula, mikro pipet, tip mikro putih (10 μL), kuning (200 μL), dan biru (1000 μL), tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), spektrofotometer UV-Vis *Mini-1240 Single Beam Shimadzu*, seperangkat alat elektroforesis horizontal (*Mupid 2 Plus*), neraca analitik, termometer, autoklaf, *magnetic stirer*, vorteks, *Centrifuge Hettich EBA III*, *High Speed Refrigerated Micro Centrifuge TOMY MX-301*, *molecular imager gel docTM XR Imaging Sistem Bio-Rad*.

Cara Kerja

Pengambilan Sampel Tanah Hutan Mangrove

Sampel tanah diambil dari kawasan pusat konservasi hutan mangrove pantai Suwung Kauh, Denpasar-Bali. Sampel tanah diambil dari satu

lokasi pada garis lintang 8°43'46,18"LS dan garis bujur 115°11'42,24"BT; dengan lima titik pengambilan berbeda pada kedalaman 0-10 cm, kemudian dicampur merata dan disimpan dalam plastik polietilen steril pada suhu -20°C.

Lisis Sel Secara Langsung dengan Penambahan Susu Skim

Lisis sel secara langsung dengan penambahan susu skim diambil dari metode Ikeda *et al.*, (2004). Sebanyak 2,0 g sampel tanah disuspensi dalam 2 mL larutan bufer ekstraksi [500 mM Tris (pH 8,0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 2% (b/v), 8 mg susu skim/gram berat tanah] dan 2 mL larutan buffer natrium fosfat 200 mM (pH 8,0). Ditambah 1,0 g glass beads kemudian divorteks selama 1 menit dan disentrifugasi selama 1 menit pada 16.000xg pada suhu ruang.

Lisis Sel Secara Langsung Tanpa Penambahan Susu Skim

Lisis sel secara langsung tanpa penambahan susu skim diambil dari metode Kuske *et al.*, (1997). Sebanyak 2,0 g tanah ditambahi 4,0 mL buffer TENS kemudian divorteks dengan kecepatan tinggi selama 1 menit lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000xg selama 10 menit. Supernatan disimpan dan peletnya diresuspensi dengan buffer TEN sebanyak 3 mL. Campuran disimpan 10 menit dalam *freezer* -20°C lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit, langkah ini diulangi 3 kali kemudian disentrifugasi pada 10.000xg selama 15 menit diperoleh pelet dan supernatan, supernatan digabung.

Tahap Ekstraksi DNA Metagenomik

Supernatan dari masing-masing hasil lisis sel di atas ditambahi larutan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25 : 24 : 1) sebanyak 1 x volume kemudian disentrifugasi pada 5.000xg selama 10 menit. Lapisan atas ditambahi isopropanol dingin sebanyak 1 x volume dan Na-asetat 3 M sebanyak 1/10 x volume total kemudian diresuspensi dan disimpan dalam *freezer* -20°C selama 2 jam. Campuran disentrifugasi selama 10 menit pada 9.100xg lalu peletnya dicuci dengan 300 µL etanol 95% dan disimpan dalam *freezer* -20°C selama 15 menit. Campuran disentrifugasi pada 9.100xg selama 15 menit dan peletnya dikeringkan dengan

vakum selama 1 menit. Pelet dicuci 1 x dengan 100 µL etanol 70% dingin dan disentrifugasi pada 9.100xg selama 10 menit, pelet dikeringkan dengan vakum selama 1 menit. Pelet dicuci kembali dengan etanol 95% dingin sebanyak 100 µL lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 9.100xg, pelet dikeringkan dengan vakum selama 1 menit dan diresuspensi dalam 50 µL buffer TE 10/0,1 kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa dan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 230 nm, 260 nm dan 280 nm.

Analisis Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,6 g agarosa dalam 60 mL bufer TAE 1x (Tris-asetat 40 mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8) dengan pemanasan. Setelah agarosa terlarut dan didinginkan sampai kira-kira suhunya 45°C, selanjutnya gel agarosa dituangkan pada cetakan dan dibiarkan memadat. Sampel DNA yang akan dielektroforesis dicampur dengan *loading bufer* 1x [*loading bufer* 6x : *bromophenol blue* 0,25% (b/v) dan sukrosa 40% (b/v)]. Elektroforesis dilakukan dalam bufer TAE pada tegangan 70-100 Volt. Elektroforesis dihentikan ketika *bromophenol blue* telah bermigrasi kira-kira 2/3 dari panjang gel. Kemudian, gel agarosa direndam dalam larutan EtBr 250 µg/mL selama 5 menit, selanjutnya direndam dalam bufer TAE atau aquades selama 10 menit. Pita DNA dapat diamati dengan sinar UV menggunakan *molecular imager gel doc*.

Analisis Spektrofotometri UV-Vis

Larutan hasil isolasi DNA total diambil 3 µL diencerkan 300x dengan bufer TE 10/0,1 pH 8 hingga volume totalnya 900 µL. Selanjutnya dituangkan ke dalam kuvet, lalu DNA total dianalisis kemurniannya pada panjang gelombang 230, 260 dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Kontaminasi asam humat terhadap DNA dapat dianalisis melalui pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 230 nm, sedangkan untuk kontaminasi protein di dalam DNA total dapat dianalisis dari perbandingan absorbansi DNA di panjang gelombang 260 dan 280 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Analisis DNA Metagenomik dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil isolasi DNA metagenomik secara langsung dengan dan tanpa penambahan susu skim ditampilkan pada Gambar 1. Lisis sel secara langsung tanpa penambahan susu skim menunjukkan intensitas pita DNA yang rendah dan berekor. Intensitas pita DNA yang rendah menandakan konsentrasi DNA yang relatif rendah dan pita DNA yang berekor cukup panjang menandakan masih adanya DNA total yang terfragmentasi. Hal ini dapat disebabkan adanya penghancuran DNA sebelum penambahan EDTA. Adanya nuklease pada hasil isolasi DNA metagenomik juga dapat menyebabkan DNA terfragmentasi.



Gambar 1. Hasil elektroforesis sampel DNA dengan metode lisis langsung (1 : Kontrol; 2 – 4 : tanpa penambahan susu skim (LK); 5 – 7 : dengan penambahan susu skim (LI))

Lisis secara langsung dengan penambahan susu skim menunjukkan intensitas pita DNA yang tinggi dan sedikit berekor. Intensitas pita DNA yang tinggi menandakan konsentrasi DNA yang cukup tinggi sementara adanya sedikit ekor pada elektroforegram menandakan DNA total relatif utuh. Intensitas pita DNA yang cukup tinggi dan sedikit berekor dapat dipengaruhi oleh

penambahan susu skim pada bufer lisis karena susu skim mampu menggantikan DNA untuk teradsorpsi ke koloid tanah sehingga DNA yang sesungguhnya dapat terdeteksi. Ikeda *et al.*, (2008) mengungkapkan bahwa penggunaan susu skim dalam bufer lisis mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas DNA tanah serta meningkatkan sensitivitas dalam analisis dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Menurut Hoshino dan Matsumoto (2005), susu skim digunakan sebagai bahan tambahan dalam ekstraksi DNA metagenomik untuk meminimalkan degradasi dan adsorpsi asam nukleat ke dalam tanah sehingga dapat meningkatkan perolehan kembali DNA. Kontaminasi DNA asing dari susu skim dapat diabaikan, PCR selanjutnya 16SrDNA tidak menghasilkan pita yang cukup untuk mendeteksi adanya DNA genom dari susu skim.

Hasil Analisis DNA Metagenomik dengan Spektrofotometri UV-Vis

Nilai absorbansi DNA pada pengukuran secara spektrofotometri akan berbanding lurus dengan konsentrasi DNA yang terkandung di dalam sampel. Absorbansi maksimal dari nukleotida terjadi pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan absorbansi maksimal dari kontaminan protein berada pada panjang gelombang 280 nm (Boyer, 2005). Kontaminasi asam humat terhadap DNA hasil isolasi dapat ditentukan dengan melihat rasio $A_{260/230}$, semakin tinggi nilai rasionya maka semakin tinggi tingkat kemurnian DNA total yang diperoleh, sedangkan semakin rendah nilai rasionya maka semakin rendah tingkat kemurnian DNA total yang diperoleh. Hasil isolasi DNA metagenomik secara langsung dengan dan tanpa penambahan susu skim yang dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa pada $A_{260/230}$ baik dengan maupun tanpa penambahan susu skim memiliki nilai yang tidak berbeda nyata terhadap asam humat. Rasio $A_{260/230}$ yang rendah (<1) karena masih adanya kontaminasi asam humat dari tanah. DNA hasil isolasi secara langsung dari tanah memiliki kemungkinan yang tinggi terkontaminasi oleh asam humat karena tidak dilakukan pemisahan matriks tanah sebelumnya.

Tabel 1. Rasio A_{260}/A_{230} , dan rasio A_{260}/A_{280} DNA metagenomik hasil isolasi dengan lisis sel secara langsung dengan dan tanpa penambahan susu skim

Sampel	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	$\bar{X}_{260/230}$	$\bar{X}_{260/280}$	$SD_{260/230}$	$SD_{260/280}$
LI	0,786	1,242				
LI	0,772	1,227	0,770	1,224	$0.77000^a \pm 0.017$	$1.22433^a \pm 0,019$
LI	0,752	1,204				
LK	0,824	1,328				
LK	0,811	1,296	0,818	1,313	$0.81833^a \pm 0.007$	$1.31300^b \pm 0,016$
LK	0,820	1,315				

Keterangan :

- LI : DNA hasil lisis sel secara langsung dengan penambahan susu skim
 LK : DNA hasil lisis sel secara langsung tanpa penambahan susu skim
 $A_{260/230}$: Rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 230 nm
 $A_{260/280}$: Rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm
 $\bar{X}_{260/230}$: Rata-rata rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 230 nm
 $\bar{X}_{260/280}$: Rata-rata rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm
 $SD_{260/230}$: Standar deviasi rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 230 nm
 $SD_{260/280}$: Standar deviasi rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm
 superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Tingkat kemurnian terhadap protein ditunjukkan oleh nilai $A_{260/280}$, diperoleh hasil bahwa dengan tanpa penambahan susu skim memiliki nilai yang berbeda nyata. DNA hasil isolasi tanpa penambahan susu skim menunjukkan rasio $A_{260/280}$ yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan susu skim, tetapi tingkat kemurnian DNA terhadap protein juga masih rendah karena nilai rasionya masih kurang dari 1,8 – 2. DNA total yang diperoleh relatif kurang murni karena rasio 260/280 untuk DNA murni berkisar antara 1,8 – 2 (Boyer, 2005).

Penambahan susu skim tidak berpengaruh terhadap kemurnian DNA terhadap asam humat tetapi berpengaruh terhadap kemurnian DNA terhadap protein. Pengaruh tersebut dapat disebabkan karena kandungan susu skim merupakan protein sehingga menyebabkan serapan di λ 280 nm tinggi dan rasio $A_{260/280}$ menjadi rendah. Untuk meningkatkan kemurnian DNA perlu dilakukan tahap pemurnian DNA lebih lanjut, agar DNA total yang diperoleh bisa terbebas dari protein atau asam humat untuk keperluan tahap berikutnya seperti kloning gen maupun analisis dengan PCR.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Susu skim sebagai bahan tambahan dalam bufer lisis memiliki pengaruh terhadap hasil isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove. Hasil elektroforesis lisis secara langsung dengan penambahan susu skim menunjukkan intensitas pita DNA yang lebih tinggi (tajam) yang menandakan DNA total yang diperoleh relatif lebih sedikit terfragmentasi. Hasil analisis dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan DNA yang diisolasi dengan dan tanpa penambahan susu skim tingkat kemurniannya tidak berbeda nyata terhadap asam humat (rasio $A_{260/230}$). Untuk tingkat kemurnian DNA terhadap protein dilihat dari rasio $A_{260/280}$, menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi tanpa penambahan susu skim memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan hasil isolasi dengan penambahan susu skim.

Saran

Pemurnian DNA perlu dilakukan untuk mengurangi kadar asam humat dan protein pada DNA total yang telah berhasil diisolasi sehingga dapat dilakukan pembuatan pustaka metagenom dengan cara kloning DNA total metagenomik

tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali untuk menemukan gen pengkode selulase yang baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak dan ibu penguji Prof. Dr. I Made Dira Swantara, I G. A. Kunti Sri Panca Dewi, S.Si., M.Si., dan James Sibarani, S.Si., M.Si., Ph.D. atas saran dan masukannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H., 1995, Phylogenetic Identification and in situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59 : 143–16
- Boyer, Rodney, 2005, *Modern Experimental Biochemistry* Third Edition, Pearson Education, Inc., India
- Hoshino, Y. T. and Matsumoto, N., 2005, Skim Milk Drastically Improves the Efficacy of DNA Extraction from Andisol, a Volcanic Ash Soil, *JARQ*, 39 (4) : 247-252
- Ikeda, S., Watanabe, K.N., Minamisawa, K., and Ytow, N., 2004, Evaluation of Soil DNA from Arable Land in Japan Using a Modified Direct-extraction Method, *Microbes Environ*, 19 (4) : 301-30
- Ikeda, S., Tsumaru, H., Wakai, S., Noritake, C., Fujishiro, K., Akasaka, M., and Ando, K., 2008, Evaluation of the Effects of Different Additives in Improving the DNA Extraction Yield and Quality from Andosol, *Microbes Environ*, 23 (2) : 159-166
- 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*, 0099-2240, 63 (9) : 3614–3621
- Leff, L.G., Dana, J.R., McArthur, J.V., and Shimkets, L.J., 1995, Comparison of Methods of DNA Extraction from Stream Sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3) : 1141–1143
- Rosalinda, A., 2012, Penggunaan Silika Bentonit dalam Pemurnian DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bali
- Torsvik, T.H., Lyse, O., Atterås, G., and Bluck, B.J., 1989, Palaeozoic palaeomagnetic results from Scotland and their bearing on the British apparent polar wander path. *Phys. Earth Planet. Inter.*, 55: 93-105
- Urban, M. and Adamczak, M., 2008, Exploration Of Metagenomes For New Enzymes Useful In Food Biotechnology – A Review, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58 (1) : 11-22
- Yuliana, D.A., 2012, Skrining Selulase dan Isolasi DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bali