

## Isolasi DNA Kromosom *Salmonellasp.* dan Visualisasinya pada Elektroforesis Gel Agarosa

<sup>1</sup>Dyah Ayu Widyastuti

<sup>1</sup>Pendidikan Biologi Universitas PGRI Semarang

Email: wid.dyah@gmail.com

**Abstrak:** Isolasi DNA merupakan salah satu metode dasar dalam biologi molekuler yang dapat digunakan untuk deteksi karakteristik organisme pada ranah molekuler. Setiap organisme memiliki urutan basa nukleotida pada DNA dalam kromosom yang unik. Keunikan tersebut menjadikan DNA sebagai salah satu media untuk deteksi molekuler tertentu. *Salmonella* sp. merupakan mikroorganisme yang memiliki struktur sel sederhana sehingga materi genetiknya mudah diisolasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memahami teknik isolasi DNA pada *Salmonella* sp. dan visualisasinya dalam elektroforesis gel agarosa. Metode dimulai dengan isolasi DNA, amplifikasi DNA hasil isolasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan visualisasi pita DNA dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil isolasi DNA menunjukkan isolat yang memiliki *optical density* (OD) cukup baik berkisar di nilai 1,9 µg/ml. DNA hasil isolasi dari kromosom *Salmonella* sp. membutuhkan amplifikasi dengan PCR sebelum divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa agar jumlah DNA dapat terdeteksi. *Optical density* (OD) pada kisaran 1,9 µg/ml menunjukkan DNA hasil isolasi yang belum cukup murni dan dimungkinkan masih adanya kontaminasi RNA akibat tidak dilakukan purifikasi.

**Kata Kunci:** DNA, elektroforesis, isolasi, kromosom, PCR

### 1. PENDAHULUAN

Kemajuan yang dicapai dalam bioteknologi dan teknik DNA rekombinan telah membantu mempercepat meningkatkan berbagai penelitian menuju arah pemahaman mengenai teknik-teknik yang dapat dimanfaatkan dalam bidang biologi molekuler. Perkembangan tersebut menuntut peneliti terutama dalam bidang bioteknologi untuk dapat menguasai teknik-teknik dasar biologi molekuler.

Penguasaan teknik-teknik dasar biologi molekuler seperti isolasi DNA maupun protein, elektroforesis baik elektroforesis gel agarosa, SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), serta PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat menjadi modal dasar bagi peneliti untuk mengembangkan penelitian demi meningkatkan kesejahteraan manusia. Dengan penguasaan teknik-teknik dasar tersebut, peneliti dapat membuat penemuan-penemuan baru yang dapat dimanfaatkan di berbagai bidang kehidupan.

Isolasi DNA merupakan salah satu teknik dasar dalam biologi molekuler yang dapat dikembangkan menjadi penelitian-penelitian yang kompleks mengenai informasi genetik yang dimiliki oleh suatu organisme. Informasi pada

DNA disimpan dalam bentuk basa nukleotida yaitu adenine (A), guanine (G), cytosine (C), dan timin (T). Setiap sekuen basa nukleotida mengandung informasi genetik yang berperan dalam perkembangan dan pengaturan organisme (Lister, 2013).

Nishiguchi *et al.* (2010) menyatakan bahwa sebuah sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan bersifat herediter pada seluruh sistem kehidupan. Suatu sel lengkap dari materi genetik (DNA) yang dimiliki oleh organisme dan terorganisasi menjadi kromosom disebut sebagai genom. DNA dapat diisolasi, baik pada manusia, tumbuhan, hewan, maupun mikroorganisme.

*Salmonellasp.* adalah salah satu patogen yang dapat mengakibatkan penyakit pada manusia. Bakteri ini tergolong dalam bakteri Gram negatif yang tidak memiliki spora, bergerak dengan flagel peritrik, bersifat intraseluler fakultatif dan fakultatif anaerob (Cita, 2011). Kontaminasi *Salmonellasp.* pada makanan dapat menyebabkan infeksi yang serius pada manusia. Deteksi *Salmonella* sp. untuk kontrol penyebaran penyakit harus dilakukan dengan teknik yang mudah, cepat, sensitif, spesifik, dan diakui secara internasional sebagai

metode diagnostik yang baik (Castagna *et al.*, 2005). Metode diagnostik standard (*gold standard*) untuk deteksi *Salmonella* pada hewan-hewan produksi adalah dengan kultur fekal. Namun, hasil negatif palsu seringkali didapatkan pada awal infeksi dan membutuhkan waktu beberapa hari ke depan untuk memberikan hasil kultur yang positif (Bordonaro *et al.*, 2013).

Umumnya isolasi *Salmonella* dari suatu sampel yang mengandung  $>10^7$  sel bakteri membutuhkan media pengaya yang selektif untuk mendukung pertumbuhan *Salmonella* dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Sahar *et al.*, 2009). Berdasarkan kelemahan tersebut, maka dikembangkan metode identifikasi *Salmonella* yang lebih cepat yaitu dengan PCR.

*Polymerase chain reaction* (PCR) dapat mendeteksi *Salmonella* secara lebih spesifik dan sensitif berdasarkan materi genetik yang dimiliki oleh jenis *Salmonella* target. DNA *Salmonella* dapat diisolasi dari inokulum untuk kemudian diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik tertentu sehingga sekuen DNA target dapat diketahui (Sunar *et al.*, 2010).

Produk PCR yang merupakan hasil amplifikasi DNA *Salmonella* sp. kemudian dapat divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa. Visualisasi memerlukan marker/penanda tertentu sehingga ukuran pita DNA yang terdeteksi dapat diketahui dan dapat digunakan sebagai pedoman apakah hasil isolasi DNA merupakan DNA target yang diinginkan. Penelitian ini bertujuan untuk memahami teknik isolasi DNA *Salmonella* sp. dan visualisasinya dalam elektroforesis gel agarosa.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama 3 bulan di Laboratorium Bioteknologi PAU Universitas Gadjah Mada.

### 2.2. Bahan dan Alat Penelitian

Penelitian ini membutuhkan kultur *Salmonella* sp. yang ditumbuhkan dalam medium Luria Bertani (LB) dan

digojog semalam pada suhu 37°C, proteinase K, buffer lisis, fenol, etanol 70%, buffer TBE, PCR mix, DNA marker, gel agarosa, TBE, loading dye, sentrifus, vortex, apparatus elektroforesis, shaker, UV illuminator, mikropipet, dll.

### 2.3. Isolasi DNA *Salmonella* sp.

*Salmonella* sp. diinokulasi pada media Luria Bertani (LB) dan digojok semalam pada suhu 37°C. Sebanyak 15 ml kultur disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan ditambahkan 750 µl buffer lisis pada pellet kemudian divortex. Proteinase K ditambahkan sebanyak 10 µl (10 mg/ml). Campuran digojog selama 15 menit. Setelah pellet, buffer lisis, dan proteinase K tercampur homogen kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Campuran selanjutnya disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Fenol ditambahkan sebanyak 700-750 µl atau dengan perbandingan 1:1 dengan sampel kemudian digojog perlahan selama 15 menit dan disentrifus selama 10 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung ependorf 1,5 ml dan ditambahkan etanol dingin 96% (perbandingan 1:1 atau 1:2). Larutan dicampur perlahan hingga terbentuk benang-benang halus berwarna putih. Benang-benang DNA tersebut diambil dan dicuci dengan etanol 70% kemudian disentrifus selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelat dikeringkan. Pada pellet yang telah dikeringkan ditambahkan TE 200 µl dan disimpan pada suhu 4°C.

### 2.4. Amplifikasi DNA *Salmonella* sp. dengan PCR

Mikrotube 25 µl disiapkan untuk membuat PCR mix yang terdiri atas 10x buffer, dNTP, Mg<sup>2+</sup>, dan taq polymerase kemudian ditambahkan 23 µl dH<sub>2</sub>O. Larutan kemudian didiamkan agar terlarut sempurna. Setelah campuran larut, kemudian

ditambahkan 1  $\mu$ l sampel DNA *Salmonella* sp. hasil isolasi dan 1 $\mu$ l primer Box Air kemudian divortex sebentar dan disentrifus selama 1 detik. Sampel yang telah disentrifus kemudian diamplifikasi dengan *repetitive* PCR 30 siklus dengan masing-masing siklus mengikuti tahapan sebagai berikut:

- a. Pre-denaturasi (94°C); 4 menit
- b. Denaturasi (92°C); 1 menit
- c. Annealing (50°C); 1-2 menit
- d. Ekstensi (68°C); 8 menit
- e. Ekstra ekstensi (68°C); 10 menit

Produk PCR berupa DNA yang telah teramplifikasi kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis.

### 2.5. Visualisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa

Sebelum dilakukan elektroforesis, sampel DNA hasil PCR diukur nilai *optical density*-nya terlebih dahulu dengan spektrofotometer. Gel agarosa disiapkan dengan konsentrasi 1%. Produk PCR sebanyak 10 $\mu$ l sampel DNA *Salmonella* sp. ditambah dengan 4 $\mu$ l *loading dye*. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel dan di-*running* dengan voltase 100 Volt. Pita DNA yang terbentuk kemudian diamati di bawah sinar UV.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada analisis DNA, ada beberapa hal yang dilakukan yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR, *running* DNA hasil isolasi maupun amplifikasi tersebut dengan elektroforesis horizontal, dan lain sebagainya.

Isolasi DNA *Salmonella* sp. dimulai dengan melisis sel dengan menambahkan buffer lisis agar DNA dapat dipisahkan dari komponen sel yang lain. Penambahan proteinase K bertujuan untuk mendegradasi protein pada sel sehingga DNA dapat diisolasi dengan baik dan tidak terkontaminasi oleh protein sel.

Prinsip isolasi DNA dapat dibagi menjadi 3 tahapan utama, yaitu:

1. Pemecahan sel atau jaringan. Tahapan ini dimaksudkan untuk mengeluarkan isi sel. Pemecahan dapat dilakukan secara fisik, misalnya dengan *freeze-thawing*, homogenisasi dengan *bead mill*, ultrasonikasi, atau penggerusan dalam nitrogen cair. Sel juga dapat dilisis secara kimiawi maupun enzimatik. Lisis secara enzimatik biasanya menggunakan proteinase K, lisozim, akromopeptidase, dan pronase E.
2. Ekstraksi DNA. Tahap ini bertujuan untuk memisahkan asam nukleat dari komponen penyusun sel lainnya. Ekstraksi dapat dilakukan menggunakan reagen yang mengandung detergen (misalnya SDS atau sarkosil), larutan yang mengandung NaCl dan berbagai buffer (biasanya Tris atau buffer fosfat pH 7 atau 8). Pada tahap ini, berbagai modifikasi biasa dilakukan, meliputi inkubasi pada temperatur tinggi, penambahan fenol atau kloroform, juga menggunakan agen pengkhelat seperti EDTA yang berfungsi untuk menghambat enzim nuklease.
3. Presipitasi DNA. Tahapan ini bertujuan mengisolasi DNA dari larutan yang digunakan selama ekstraksi. Pengendapan DNA dapat dilakukan dengan menambahkan etanol dingin beserta NaCl yang masih terdapat dalam ekstrak. Dari hasil pengendapan DNA akan diperoleh benang-benang DNA berwarna putih.

Kultur *Salmonella* sp. disentrifus untuk memisahkan sel dari komponen kultur lainnya. Selain itu juga ditambahkan buffer lisis untuk melisis sel sehingga komponen di dalam sel termasuk DNA dapat keluar. Penggojogan dengan vortex bertujuan untuk

homogenisasi larutan sampel (Anonim, 2000).

Untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya ditambahkan fenol (Santos *et al.*, 2001; Moors, 2011) dengan perbandingan 1:1 dengan sampel agar jumlah DNA yang terpisah dapat optimal. Fenol digunakan untuk ekstraksi DNA dari komponen sel. Ekstraksi dimaksudkan untuk membebaskan DNA dari kontaminan-kontaminan lain yang terdapat di dalam sel, misalnya protein, RNA, maupun materi-materi lainnya (Gaikwad, 2002). Setelah DNA berhasil diekstraksi, tahapan isolasi DNA yang terakhir adalah presipitasi DNA. Pengendapan DNA dilakukan dengan menambahkan etanol absolut dingin hingga terbentuk benang-benang DNA berwarna putih.

DNA *Salmonella* sp. hasil isolasi selanjutnya diukur nilai *optical density*-

nya untuk mengetahui kualitas DNA tersebut. Nilai *optical density* yang baik untuk DNA hasil isolasi adalah antara 1,8-2,0. Jika *optical density* (OD) bernilai lebih dari 2,0 maka DNA hasil isolasi tersebut masih terkontaminasi RNA. Sedangkan jika nilai *optical density* kurang dari 1,8 maka dimungkinkan DNA hasil isolasi masih terkontaminasi protein.

Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran *optical density* pada 5 sampel DNA *Salmonella* sp. hasil isolasi. Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi memiliki nilai OD yang cukup baik yaitu berkisar di 1,9. Hasil tersebut tidak mengindikasikan adanya kontaminasi RNA maupun protein. Namun, hasil tersebut masih harus dikonfirmasi dengan elektroforesis horizontal setelah sampel DNA diamplifikasi dengan PCR.

**Tabel 1.** Hasil pengukuran *optical density* (OD) hasil isolasi DNA

Sampel ID	abs 260,0 nm	abs 280,0 nm	260,0 nm 280,0 nm
BS <sub>1</sub>	0,5301	0,2783	1,9615
BS <sub>2</sub>	0,8583	0,4432	1,9185
BS <sub>3</sub>	1,4827	0,7394	2,0053
BS <sub>4</sub>	1,5081	0,7579	1,9899
BS <sub>5</sub>	1,0671	0,5384	1,9822

Keterangan: S<sub>1-5</sub> adalah sampel 1-5

Pengukuran OD dilakukan dengan membuat larutan yang memiliki volume 700 µl dan terdiri dari 7 µl sampel DNA *Salmonella* sp. yang dilarutkan dalam 693 µl akuades. Spektrofotometer yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis. Nilai OD didapatkan dari nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 nm dibagi nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm.

Meskipun telah diukur nilai OD-nya, untuk membuktikan bahwa isolat DNA yang didapatkan memang benar DNA *Salmonella* sp., maka dibutuhkan rangkaian pengujian selanjutnya. Agar

dapat divisualisasikan dengan baik dengan elektroforesis, sampel DNA terlebih dahulu diamplifikasi dengan PCR.

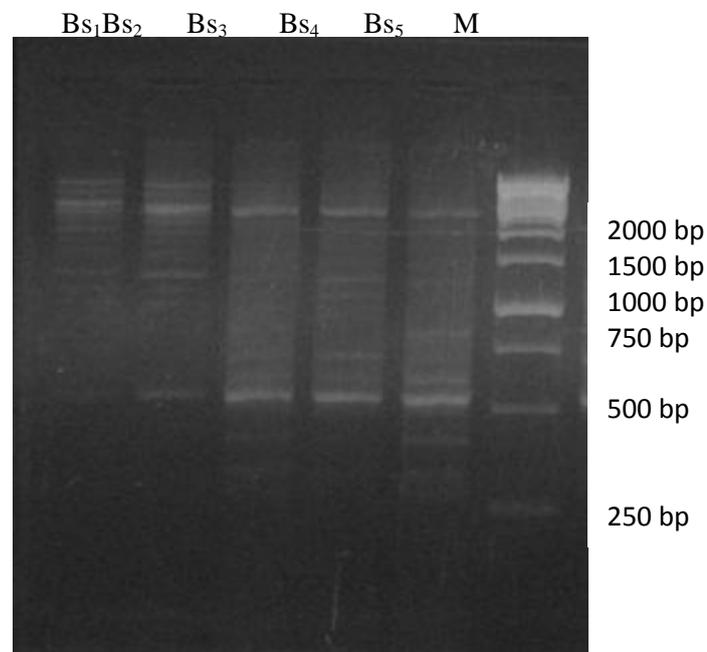
*Polymerase chain reaction* dilakukan sebanyak 30 siklus dengan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, denaturasi pada 92°C selama 1 menit, annealing pada 50°C selama 1-2 menit, ekstensi/elongasi pada 68°C selama 8 menit, dan ekstra ekstensi pada 68°C selama 10 menit.

Primer yang digunakan adalah BoxAir dengan sekuen 5'-CTACGG CA AGGCGACGCTGACG-3' (Wulan,

2014).Primer ini digunakan untuk mengenali spesifik *fingerprint* untuk strain bakteri Gram negatif tertentu (Bhattacharya *et al.*, 2003). Primer BoxAir umumnya menghasilkan produk amplifikasi PCR yang baik untuk menunjukkan keragaman genotip antar bakteri yang berbeda.Biasanya primer BoxAir dapat membantu dalam penyusunan dendogram untuk melihat tingkat filogenetik mikroorganisme.Penggunaan primer BoxAir secara akurat dapat menunjukkan perbedaan genotip bakteri yang telah teradaptasi oleh lingkungannya sehingga

terbentuk keanekaragaman genetik (Jin *et al.*, 2011).

Fungsi Mg<sup>2+</sup> adalah untuk membentuk kompleks solubel dengan dNTP dan cetakan DNA untuk memproduksi substrat yang dapat dikenali oleh enzim polymerase sehingga elongasi dapat terjadi.Untuk dNTP harus menggunakan larutan yang seimbang untuk keempat basa nukleotida untuk meminimalisasi terjadinya kesalahan.Taq polimerase merupakan enzim yang digunakan untuk ekstensi/elongasi untai DNA baru.



Gambar 1. Visualisasi sampel DNA *Salmonella* sp. hasil amplifikasi PCR pada gel agarosa 1% dengan marker DNA ladder

Hasil elektroforesis pada Gambar 1 menunjukkan terbentuknya pita-pita DNA pada semua sampel. Namun, pada Bs<sub>1</sub> dan Bs<sub>2</sub> pita DNA yang terbentuk sedikit lebih tipis dibanding sampel lainnya. Hal tersebut disebabkan oleh kecilnya kandungan DNA pada sampel Bs<sub>1</sub> dan Bs<sub>2</sub> tersebut. Namun, secara keseluruhan, semua sampel DNA menunjukkan adanya pita-pita DNA yang terbentuk.

Hasil visualisasi pita DNA yang terlihat masih membentuk *smear* dan belum berhasil membentuk pita DNA tunggal yang jelas. Pita DNA paling jelas terpisah pada ukuran di atas 2000 bp dan di ukuran 500 bp. Ukuran segmen DNA masih cukup besar karena DNA belum dimurnikan. Pada sampel Bs<sub>1-5</sub>, terbentuk pita DNA dengan ukuran lebih dari 2000 bp, sedangkan untuk pita DNA dengan ukuran 500 bp tidak terbentuk pada Bs<sub>1</sub> dan pada Bs<sub>2</sub> terbentuk sangat tipis. Pita DNA berukuran 500 bp terbentuk jelas pada Bs<sub>3-5</sub>.

Polymerase chain reaction dengan primer BoxAir yang digunakan sudah tepat untuk sampel yang berupa DNA *Salmonella* sp. Namun, hal tersebut belum cukup untuk mengoptimalkan pita DNA yang terbentuk karena penggunaan primer BoxAir membutuhkan kemurnian sampel agar pita DNA yang terbentuk memiliki resolusi yang baik (Yang & Yen, 2012).

#### 4. SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

DNA *Salmonella* sp. hasil isolasi dapat divisualisasikan seluruhnya melalui elektroforesis gel agarosa. DNA yang didapatkan belum berupa DNA murni karena belum melalui tahap purifikasi DNA. DNA *Salmonella* sp. hasil isolasi

memiliki nilai *optical density* (OD) cukup baik yaitu berkisar di nilai 1,9 µg/ml dan menunjukkan pada DNA hasil isolasi masih terdapat adanya kontaminasi RNA.

Untuk penelitian selanjutnya agar didapat DNA hasil isolasi yang murni, maka diharuskan untuk melakukan purifikasi terlebih dahulu. Sehingga DNA *Salmonella* sp. yang berhasil diisolasi dapat dimanfaatkan untuk pengujian yang lebih luas lagi setelah berhasil dimurnikan.

#### 5. Daftar Pustaka

- Anonim.(2000). *DNA extraction from bacteria*. Diakses dari [http://www.biotech.iastate.edu/wp\\_single/wp-content/uploads/2013/04/DNA\\_Extraction\\_Bacteria.pdf](http://www.biotech.iastate.edu/wp_single/wp-content/uploads/2013/04/DNA_Extraction_Bacteria.pdf)
- Bhattacharya, D., P. M. Sarma, S. Krishnan, S. Mishra, and B. Lal.(2003). Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3), 1435-1441.
- Bordonaro, R., P. L. McDonough, Y. Chang, and H. O. Mohammed.(2013). Molecular detection of *Salmonella* species in bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(6), 756-758.
- Castagna, S. M. F., M. Muller, M. Macagnan, C. R. Rodenbusch, C. W. Canal, and M. Cardoso. (2005). *Brazilian Journal of Microbiology* (36), 373-377.
- Cita, Y. P. (2011). Bakteri *Salmonella typhi* dan demam tifoid. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 6(1), 42-46.
- Gaikwad, A. B. (2002). *DNA extraction: Comparison of methodologies*. Diakses dari [http://chaudhary.kau.edu.sa/Files/0030235/files/19044\\_2nd%20YR%20MY%20Lab%20DNA%20extract\\_Mol](http://chaudhary.kau.edu.sa/Files/0030235/files/19044_2nd%20YR%20MY%20Lab%20DNA%20extract_Mol)

- [ecular%20Genetics%20Lect%202nd%20yr%20MT%201st%20semester.pdf](#)
- Jin, F., Y. Ding, W. Ding, M. S. Reddy, W. G. D. Fernando, and B. Du. (2011). Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *International Journal of Molecular Sciences* (12), 3055-3071. Doi: 10.3390/ijms12053055.
- Lister, H. (2013). *Cells and DNA*. National Institute of Health. Department of Health and Human Services. USA.
- Moors, H. (2011). *DNA/RNA extraction: An overview of principles and methods*. Diakses dari [http://www.cytometry.be/~media/Files/BSAC/Events/Mol\\_2011/DNAExtraction.pdf?la=en](http://www.cytometry.be/~media/Files/BSAC/Events/Mol_2011/DNAExtraction.pdf?la=en)
- Nishiguchi, M. K., P. Doukakis, M. Egan, D. Kizirian, A. Phillips, L. Prendini, H. C. Rosenbaum, E. Torres, Y. Wyner, R. de Salle, and G. Giribet. (2010). *DNA Isolation Procedures*. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland.
- Sahar, Z., Desouky, A. E. Haleem, E. Ehab, and M. Marwa. Molecular and biochemical diagnosis of *Salmonella* in wastewater. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 13(2), 83-92.
- Santos, L. R. d, V. P. do Nascimento, S. D. de Oliveira, M. L. Floves, A. P. Pontes, A. R. Ribeiro, C. T. P. Sallee, and R. F. F. Lopes. (2001). Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Journal of the Sao Paulo Institute of Tropical Medicine* 43(5), 247-250.
- Sunar, N. M., E. I. Stentiford, D. I. Stewart, and L. A. Fletcher. (2010). Molecular techniques to characterize the *invA* genes of *Salmonella* spp. For pathogen inactivation study in composting. *ORBIT*, 1-10.
- Wulan, T. (2014). Asosiasi aktivitas selulolitik dan analisis molekuler dengan metode *Rep-PCR* dari *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Departemen Biokimia. Institute Pertanian Bogor.
- Yang, A. and C. Yen. (2012). PCR optimization of BOX-AIR PCR for microbial source tracking of *Escherichia coli* in waterways. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* (16), 85-89.