

Purifikasi DNA Kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea

Budi Putri Ayu, Purbowatiningrum Ria S., Agustina L.N. Aminin

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang

Email: agustina_lna@undip.ac.id

ABSTRACT

Studi pemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 menggunakan silika gel dengan denaturan urea telah dilakukan. Pemurnian dilakukan dengan metode adsorpsi silika tanpa kolom dan dengan kolom untuk menentukan metode yang lebih efisien dalam pemurnian DNA kromosom. Metode adsorpsi silika dengan kolom dilakukan dengan sentrifugasi dan tanpa sentrifugasi. Variasi konsentrasi 6 - 9 M urea dengan 25 mg silika gel digunakan untuk mempelajari profil kapasitas urea dalam pemurnian DNA kromosom. Pengukuran tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA dianalisis dengan metode spektrofotometri. Hasil menunjukkan bahwa metode adsorpsi silika yang efisien dalam pemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 adalah metode kolom silika dengan sentrifugasi. DNA yang diperoleh pada urea konsentrasi 6 - 9 M memiliki nilai kemurnian sekitar 1,2. Namun, urea 8 M merupakan konsentrasi optimum untuk pemurnian DNA kromosom karena diperoleh kadar DNA yang paling tinggi, yaitu sebesar 811 µg/mL

Keywords: pemurnian DNA kromosom, kolom silika, denaturan, urea.

PENDAHULUAN

DNA kromosom yang benar-benar murni dan bebas kontaminan sangat dibutuhkan dalam teknologi rekayasa DNA. Kontaminan dapat menghambat reaksi kimia pada tahap kerja teknologi DNA selanjutnya. Kontaminan dapat berupa enzim, protein, dan lipid. Oleh karena itu, diperlukan metode pemurnian yang efisien dan efektif untuk menghilangkan kontaminan tersebut (Padhye dkk., 1997). Pemurnian DNA kromosom secara konvensional seperti ekstraksi fenol-kloroform dan sentrifugasi gradien EtBr dan CsCl, membutuhkan waktu yang lama dan prosedur yang rumit (Tan dan Yiap, 2009). Oleh karena itu, akhir-akhir ini metode adsorpsi silika lebih banyak digunakan dalam pemurnian DNA. Prinsip dari metode ini adalah pengikatan molekul air oleh denaturan dan adanya ikatan hidrogen antara gugus silanol (SiOH^-) pada silika dengan atom oksigen pada gugus fosfat DNA. Pemurnian DNA kromosom menggunakan silika tidak membutuhkan waktu lama dan biaya tinggi, serta tidak menggunakan pelarut organik. Protein dan RNA dapat dihilangkan pada saat pencucian (Luka, 2000). Selain itu, dapat dihasilkan DNA kromosom dengan kemurnian tinggi karena metode silika ini dapat menghilangkan residu fenol dan kloroform (Tan dan Yiap, 2009; Yang dkk., 1998). Pemurnian

DNA kromosom dengan silika dapat dilakukan dengan kolom (Ravichandran, 2002) dan tanpa kolom (Luka, 2000).

Metode adsorpsi silika pada umumnya menggunakan denaturan guanidin HCl atau guanidin tiosianat. Urea merupakan garam denaturan lain yang lebih mudah didapat di pasaran. Menurut Rashid dkk. (2005), urea dapat bertindak sebagai agen denaturan protein pada konsentrasi 6 - 8 M. Dibandingkan dengan guanidin HCl atau guanidin tiosianat, kemampuan urea dalam mengikat molekul air di sekitar protein lebih rendah. Informasi mengenai tingkat efektivitas urea untuk memurnikan DNA kromosom dengan silika sejauh ini belum diketahui. Kebanyakan peran urea untuk kerja terhadap biomolekul seperti DNA lebih banyak digunakan dalam DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Ercolini, 2004).

Pada penelitian ini dilakukan studi kapasitas urea dalam pemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14. Bakteri *Geobacillus sp.* dYTae-14 merupakan salah satu spesies koleksi Grup "Termofilik dan Enzim Termostabil" Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FSM, UNDIP; yang diisolasi dari sumber air panas Gedong Songo Jawa Tengah. Tahap awal yang dilakukan adalah isolasi DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 dan pemurnian awal dengan ekstraksi kloroform - isoamilalkohol.

Selanjutnya, dilakukan pemurnian DNA menggunakan metode adsorpsi silika tanpa kolom dan dengan kolom untuk menentukan metode yang efisien dalam pemurnian DNA kromosom. Metode adsorpsi silika dengan kolom dilakukan dengan sentrifugasi dan tanpa sentrifugasi. Variasi konsentrasi 6 - 9 M urea menggunakan 25 mg silika gel dilakukan untuk mengetahui profil kapasitas urea dalam pemurnian DNA kromosom.

METODE PENELITIAN

Bahan

Starin bakteri *Geobacillus sp.* dYTae-14 diperoleh dari kultur koleksi Laboratorium Biokimia Universitas Diponegoro. Bahan-bahan lain diperoleh dari Sigma, seperti: bacto agar, TAE (Tris-Asetat EDTA), ekstrak ragi, EtBr (Etidium Bromida), gel agarosa, glukosa, *loading dye* (0,25% *bromphenol blue*, 40% sukrosa), Natrium asetat, Natrium EDTA, SDS (Sodium Dodesil Sulfat), Bubuk silika-gel (Kiselgel 60), Tripton, Tris-HCl, Urea. Bahan dari Merck meliputi: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, dan NaCl

Pembiakan Bakteri

Bakteri *Geobacillus sp.* dYTae-14 diremajakan dan diperbanyak dalam BSM (Basal Salin Medium) - YT (Yeast Tripton) 0,05%. BSM mengandung 1,78 g K_2HPO_4 , 0,2175 g KH_2PO_4 , 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeCl_3$, 0,05 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, dan 0,05 g NaCl dilarutkan dalam 0,5 L akuades. Selanjutnya ditambah 0,05% tripton dan 0,05% ekstra *yeast*, HCl 3 N dan NaOH 2 N sampai pH 6. Pada kondisi semi anaerob, bakteri diinkubasi pada suhu 55°C selama 28 jam.

Isolasi DNA Kromosom

DNA diekstraksi dengan metode Aminin dkk. (2008). Sebanyak 2 mL kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit. Pelet sel dicampur dengan 300 μ L buffer ekstraksi DNA. Larutan ditambah dengan 10 μ L proteinase K (20 mg/mL) dan 0,2 g pasir laut steril dengan penggojogan selama 10 menit. Setelah digojog, ditambahkan 30 μ L 20% SDS dan sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 1 jam dengan dibolak-balik setiap 15-20 menit.

Supernatan dikumpulkan menjadi satu setelah disentrifus pada 5000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan dipindahkan ke dalam tabung mikro. Selanjutnya siap digunakan untuk pemurnian menggunakan silika.

Penentuan Metode Efisien dalam Pemurnian DNA Kromosom

a. Silika tanpa kolom

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode Luka (2000). Ekstrak kasar DNA ditambah larutan urea 6 M dan 25 mg silika gel. Larutan diinkubasi pada 57°C selama 5 menit dan disentrifus pada 10000 rpm selama 15 detik. Pelet ditambah dengan 500 μ L larutan pencuci dingin dan disentrifus pada 10000 rpm selama 15 detik, supernatan dibuang. Tahap ini diulang 2x. Pelet dikeringkan beberapa menit dan diresuspensi dengan 50 μ L TE (Tris-EDTA) lalu diinkubasi pada 57°C selama 5-10 menit. Larutan disentrifus pada 10000 rpm selama 30 detik. DNA terdapat dalam supernatan dan disimpan pada *freezer* untuk dianalisis lebih lanjut

b. Kolom silika dengan sentrifugasi

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode Ravichandran (2002). Ekstrak kasar DNA dimasukkan ke dalam kolom spin yang sudah diberi 25 mg silika gel dan disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang ada di dalam tabung dibuang dan kolom dipindah ke tabung mikro baru. Sebanyak 250 μ L larutan urea 6 M ditambahkan ke dalam kolom dan disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit. Supernatan kembali dibuang. Pelet ditambah dengan larutan pencuci dingin dan disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit, supernatan dibuang. Sentrifugasi diulang sekali lagi pada 12000 rpm selama 90 detik untuk menghilangkan sisa-sisa larutan pencuci. Kolom dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan 50 μ L TE lalu disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit. DNA terdapat dalam supernatan yang terkumpul disimpan pada *freezer* untuk dianalisis lebih lanjut

c. Kolom silika tanpa sentrifugasi

Ekstrak kasar DNA dimasukkan ke dalam kolom spin yang sudah diberi 25 mg silika gel dan supernatan dibiarkan turun selama 15 menit. Supernatan yang ada di dalam tabung dibuang

dan kolom dipindah ke tabung mikro baru. Sebanyak 250 μ L larutan urea 6 M ditambahkan ke dalam kolom dan supernatan dibiarkan turun selama 15 menit. Supernatan kembali dibuang. Pelet ditambah dengan larutan pencuci dingin dan supernatan dibiarkan turun selama 15 menit lalu dibuang. Kolom dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan 50 μ L TE lalu supernatan dibiarkan turun selama 15 menit. DNA terdapat dalam supernatan yang terkumpul disimpan pada *freezer* untuk dianalisis lebih lanjut

Penentuan kapasitas urea sebagai agen denaturan

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode Ravichandran (2002). Ekstrak kasar DNA diperlakukan sama dengan metode kolom silika dengan sentrifugasi (b) namun menggunakan larutan urea dengan variasi konsentrasi 6, 7, 8, dan 9 M yang ditambahkan ke dalam kolom.

Elektroforesis Gel Agarosa

Sebanyak 250 mL larutan buffer TAE 1x dibuat dengan cara mencampurkan 5 mL TAE (Tris Asetat EDTA) 50x ke dalam 245 mL akuades. Gel agarosa 0,8% dibuat dengan cara 0,2 g agarosa dilarutkan ke dalam buffer TAE 1x hingga volum 25 mL. Sebanyak 10 μ L sampel DNA dan 2 μ L *loading dye* 6x dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan pada voltase 70 V dan waktu *running* 45 menit (Sambrook dan Russel, 2001).

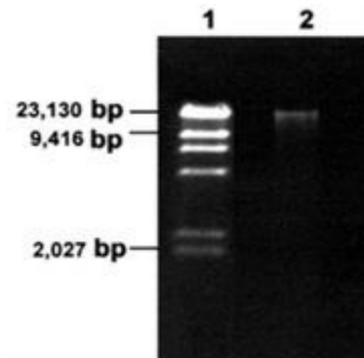
Penentuan Konsentrasi dan Tingkat Kemurnian DNA Kromosom

Sebanyak 50 μ L DNA dalam buffer TE hasil pemurnian diencerkan dengan pengenceran 100x menjadi 5 mL. Pengukuran konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* dilakukan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Sambrook dan Russel, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi DNA dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa seperti tampak pada Gambar 1. Pita DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* tampak sejajar dengan marker 23130 pasang basa. Pembacaan ini menandakan DNA kromosom telah mengalami fragmentasi pada

saat isolasi. Namun, DNA kromosom yang diperoleh merupakan hasil isolasi yang baik karena tidak terjadi *smear*.



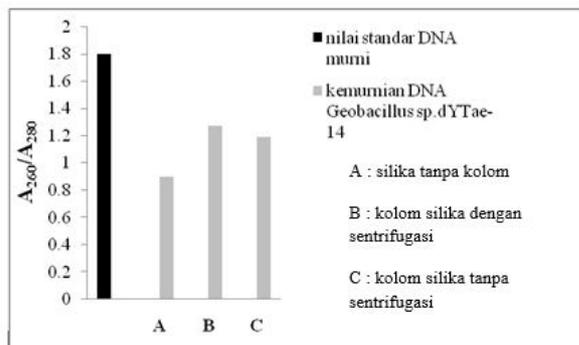
Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA. Sumur 1= marker DNA; sumur 2= DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14*

Isolasi DNA kromosom diawali dengan proses lisis sel secara kimiawi menggunakan buffer ekstraksi DNA, proteinase K, dan SDS. Buffer ekstraksi DNA mengandung NaCl dan EDTA. NaCl menyebabkan perbedaan gradien antara di dalam dan luar sel sehingga dinding sel menjadi rusak sedangkan EDTA berperan sebagai pengkelat ion Mg^{2+} (kofaktor enzim DNase). Bakteri *Geobacillus sp. dYTae-14* memiliki dinding sel yang kuat dan tebal sehingga pasir laut steril perlu ditambahkan untuk melisis sel secara fisik. Proteinase K berperan untuk memutus ikatan gugus karboksil antara asam amino alifatik dan aromatik dalam ikatan peptida yang menyusun lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri (Ebeling dkk., 1974). Deterjen dapat merusak membran sel melalui ikatan yang dibentuk oleh sisi hidrofobik deterjen dengan protein dan lemak pada membran.

Metode Adsorpsi Silika Yang Efisien

Hasil penentuan metode adsorpsi silika yang efisien dapat dilihat pada grafik Gambar 2. DNA dinyatakan murni apabila memiliki perbandingan A_{260} dan A_{280} sebesar 1,8-2 (Sambrook dan Russel, 2001). Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa DNA yang diperoleh pada metode silika tanpa kolom menunjukkan kemurnian paling rendah dibandingkan dengan kedua metode lainnya. Hal ini disebabkan minimnya kontak antara silika dengan DNA, karena silika tersebar dalam larutan. DNA yang dilewatkan dalam kolom yang mengandung silika, akan

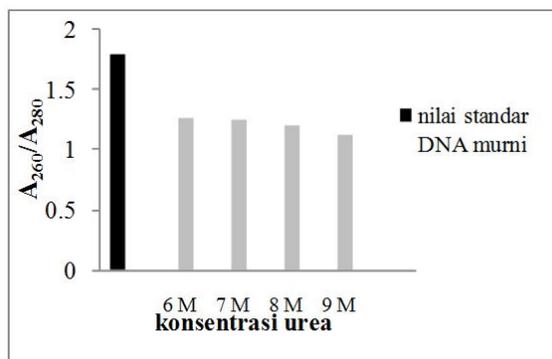
mengalami kontak yang lebih optimal karena silika terkonsentrat dalam kolom. DNA yang diperoleh pada metode kolom silika dengan sentrifugasi dan tanpa sentrifugasi relative memiliki nilai kemurnian yang tidak terlalu jauh berbeda, dengan hasil sedikit lebih tinggi untuk kolom yang disentrifugasi. Pada metode kolom silika dengan sentrifugasi, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan tinggi selama 1 menit. Perlakuan ini mengurangi waktu kontak antara DNA dengan DNase yang mungkin masih tertinggal. Oleh karena itu, DNA yang diperoleh pada metode ini cenderung lebih murni. Pada metode kolom silika tanpa sentrifugasi dilakukan pendiaman selama 15 menit, merupakan waktu yang cukup lama yang memungkinkan terjadinya kontak antara DNase dengan DNA.



Gambar 2. Grafik perbandingan nilai kemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* pada beberapa metode adsorpsi silika

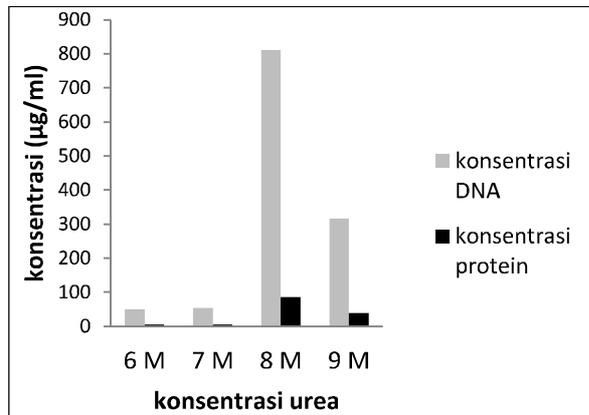
Profil Kapasitas Urea dalam Pemurnian DNA Kromosom

Pemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* dilakukan menggunakan silika gel sebanyak 25 mg dan variasi konsentrasi urea 6 – 9 M. Hasil pemurnian dapat dilihat pada grafik Gambar 3.



Gambar 3. Grafik perbandingan nilai kemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* pada metode kolom silika dengan sentrifugasi dan variasi konsentrasi urea

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa nilai kemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp. dYTae-14* berada pada kisaran 1,2. Pada konsentrasi urea 6 M dan 7 M, nilai kemurnian DNA yang diperoleh sedikit lebih tinggi. Kemurnian DNA kromosom yang diperoleh pada penelitian ini memiliki nilai yang cukup rendah dibandingkan standar DNA murni yaitu 1,8 - 2 (Sambrook dan Russel, 2001). Hal ini menandakan bahwa masih terdapat kontaminan protein dalam DNA kromosom, dimana molekul air di sekitar DNA belum terikat seluruhnya oleh molekul urea. Pada konsentrasi urea yang lebih tinggi, yaitu 8 M dan 9 M, tingkat kemurnian justru mulai mengalami penurunan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh molekul urea sudah mulai mendenaturasi protein. Hidrasi urea yang terjadi melalui gugus amino, menyebabkan hilangnya molekul air di sekitar protein. Hal ini mengakibatkan kekuatan ikatan hidrogen antara molekul air dan protein menjadi berkurang. Lipatan protein menjadi sangat terbuka dan protein teragregasi (Nandel dkk., 1998). Agregasi protein ini menyebabkan kelarutan protein berkurang sehingga masih banyak protein yang tertinggal di dalam kolom.



Gambar 4. Grafik perbandingan konsentrasi DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 dan konsentrasi protein yang diperoleh dari metode kolom silika dengan sentrifugasi dan variasi konsentrasi urea

Berdasarkan grafik pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa pada urea 8 M diperoleh DNA dan protein dengan konsentrasi sangat tinggi. Sedangkan urea 6 M dan 7 M menghasilkan konsentrasi DNA dan protein lebih rendah. Pada konsentrasi 6 M dan 7 M, kemungkinan besar molekul urea belum mampu sepenuhnya mengikat molekul air di sekitar protein dan DNA. Molekul urea juga belum menyerang molekul protein dan DNA sehingga konsentrasi DNA dan protein yang diperoleh sangat rendah. Pada urea dengan konsentrasi 8 M, diperoleh konsentrasi DNA dan yang sangat tinggi. Hal ini mengindikasikan bahwa sebagian besar molekul air di sekitar protein dan DNA sudah cukup terikat oleh molekul urea. Di sisi lain, molekul urea juga sudah menyerang molekul protein secara lebih optimal sehingga banyak terbentuk agregat protein. Pada urea 9 M, molekul urea juga mulai menyerang molekul DNA. Molekul DNA terbuka menjadi untai-tunggal atau nukleotida bebas sehingga cenderung membentuk ikatan hidrogen intramolekuler. Molekul protein juga sudah rusak menjadi oligopeptida. Oleh karena itu, konsentrasi DNA dan protein yang diperoleh sudah sangat menurun pada urea 9M.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa metode adsorpsi silika yang efisien dalam pemurnian DNA kromosom *Geobacillus sp.* dYTae-14 adalah metode kolom silika dengan sentrifugasi. Urea 8 M merupakan

konsentrasi optimum untuk pemurnian DNA kromosom karena diperoleh kadar DNA yang paling tinggi, yaitu sebesar 811 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Aminin, A.L.N, Madayanti, F.W., Aditiawati, P., dan Akhmaloka, 2008, Simple Enrichment and Independent Cultures to Expand Bacterial Community Analysis from Gedong Songo Hot Spring, *J. Bioscience and Bioengineering*, Vol. 106, No. 2, 211-214
- [2] Ebeling, W., 1974, Proteinase K from *Trilirachium album* Limber, *Eur J. Biochem*, 47, 91-97
- [3] Ercolini, D., 2004, PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food, *J. Microbiol. Meth.*, 56 , 297-314
- [4] Luka, J., 2000, DNA Purifications From Various Sources, Department of Pathology, Eastern Virginia Medical School, Virginia
- [5] Nandel, F.S., Verma, R., Singh, B., dan Jain, D.V.S., 1998, Mechanism of Hydration of Urea and Guanidium Ion: A Model Study of Denaturation of Proteins, *Pure & Appl. Chem.*, 70 (3), 659-664
- [6] Padhye, V.V., York, C., dan Burkiewicz, A., 1997, Nucleic Acid Purification On Silica Gel and Glass Mixtures, US Patent 5658548 C1
- [7] Rashid, F., Sharma, F., dan Bano, B., 2005, Comparison of Guanidine Hydrochloride (GdnHCl) and Urea Denaturation on Inactivation and Unfolding of Human Placental Cystatin (HPC), *Protein J.*, 24 (5), 283-292
- [8] Ravichandran, M., 2002, Plasmid Extraction, Department of Biomedical Microbiology and Parasitology, Universiti Sains Malaysia, Malaysia, hlm.1-2
- [9] Sambrook, J., dan Russel, D.W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [10] Tan, S.C., dan Yiap, B.C., 2009, DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009, 1-10
- [11] Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C., dan Saunders, S.R., 1998, Technical

Note: Improved DNA Extraction from Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns, *Am. J. Phy. Anthropol.*, 105, 539-543