

# EKSTRAKSI DNA *Collocalia fuchiphaga* DENGAN METODE *PHENOL CHLOROFORM EXTRACTION* DARI BERBAGAI MATERIAL SUMBER GENETIK

Hendra<sup>1)</sup>, Natalia Widya Yuda Suryaningtyas<sup>2)</sup>, Cellica Riyanto<sup>3)</sup>, Aditya Fendy Heryanto<sup>4)</sup>

<sup>1</sup>Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
email: hendrachrissevand@gmail.com

<sup>2</sup>Biologi, Fakultas Teknobiologi,  
Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
email: natalia\_widya90@yahoo.com

<sup>3</sup>Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
email: moshzartz\_japanlover@yahoo.co.id

<sup>4</sup>Biologi, Fakultas Teknobiologi,  
Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
email: fendyloe@yahoo.com

## Abstract

*DNA extraction is the first important step in molecular study. The aim of this research was to compare DNA extraction protocols, PCE and extraction kit for each genetic material sources (blood and feathers). For PCE method, we used three different extraction buffer. This study suggested that PCE method was more efficient than the extraction kit method. Meanwhile, extraction buffer 2 was more efficient for extracting feather DNA, while extraction buffer 3 was more efficient for extracting blood DNA. Wing feather was a favorable sample as genetic source for DNA extraction.*

**Keywords:** *DNA extraction, phenol-chloroform, Collocalia fuchiphaga*

## 1. PENDAHULUAN

Burung walet telah banyak dimanfaatkan oleh manusia untuk diambil sarangnya sebagai obat dan bahan makanan (Adiwicaksana, 2006), sehingga banyak dibudidayakan dalam rumah walet. Kegiatan budidaya ini dapat mempengaruhi ekosistem karena burung walet termasuk spesies kunci pada habitat alaminya yaitu goa. Kemelimpahan populasi walet di habitat buatan kurang diimbangi dengan penelitian. Penelitian untuk kepentingan konservasi dan ekologi populasi selama ini lebih banyak dilakukan secara konvensional, dimana metode tersebut kurang efektif untuk spesies yang memiliki jarak jelajah yang luas seperti burung walet (25–40 km) (Mardiastuti *et al.*, 1998).

Pendekatan molekuler menjadi solusi untuk konservasi dan ekologi yang tidak bisa terjawab dengan metode konvensional. Metode ekstraksi merupakan tahap awal yang paling penting dalam penelitian molekuler. Penelitian molekuler umumnya memerlukan biaya yang

besar, oleh karena itu diperlukan penelitian dengan menggunakan metode molekuler yang lebih murah, salah satunya metode *phenol chloroform extraction* (PCE). Metode ini memiliki kelemahan dalam hal konsistensi hasil ekstraksi, oleh karena itu perlu adanya optimalisasi metode PCE terhadap berbagai sumber material genetik yang sering digunakan pada spesies *Collocalia fuchiphaga*.

Penelitian ini bertujuan membandingkan hasil ekstraksi menggunakan tiga jenis buffer ekstraksi (buffer ekstraksi dalam metode PCE standar di laboratorium Biomolekuler Fakultas Teknobiologi UAJY, buffer ekstraksi menurut Bello *et al.* dan buffer ekstraksi menurut Khosravinia *et al.*) dengan hasil ekstraksi DNA menggunakan kit ekstraksi. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk membandingkan dua sumber materi genetik, yaitu darah dan bulu. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya yang menggunakan burung walet sebagai objek

penelitiannya.

## 2. METODE

Kegiatan penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel darah dan bulu burung walet di kota Airmolek, Riau. Proses ekstraksi DNA dan uji kualitatif hasil ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, sedangkan uji kuantitatif hasil ekstraksi DNA diperoleh dari hasil pengujian di Fakultas Kedokteran Umum, Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Gadjah Mada.

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain mikropipet, *tip*, *microtube*, *tube stand*, *waterbath shaker*, *electroporator*, *microcentrifuge*, *microwave* dan *gel documentation system*.

Bahan utama yang digunakan yaitu *DNEasy Extraction Kit* dari Qiagen, *phenol:chloroform:isoamyl* (25:24:1); *chloroform:isoamyl* (24:1); 700µl buffer ekstraksi 1 (terdiri dari 100mM Tris-HCl pH 8; 5mM EDTA pH 8; 100mM NaCl dan 0,5% SDS pH 7); 500µl buffer ekstraksi 2 berdasarkan penelitian Bello (2001) (terdiri dari 50mM Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA; 2% SDS; 175µg/ml Proteinase K); dan 500µl buffer ekstraksi 3 merupakan modifikasi dari Khosravinia *et al.* (2007) (terdiri dari 5M NaCl; 1M Tris pH 8; 0,5 M EDTA; 10% SDS; 3µg/ml Proteinase K).

Sampel darah diambil dengan menggunakan jarum suntik 26G pada vena jugularis burung, kemudian disimpan dalam *Queen's Lysis Buffer* (Seutin *et al.*, 1991). Pengambilan bulu dilakukan pada bulu sayap dan bulu dada. Bagian sayap dan dada burung walet dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 70%, kemudian bulu dicabut secara perlahan dan disimpan dalam plastik (diberi label) sebagai sampel. Tahapan ekstraksi metode PCE dengan berbagai buffer ekstraksi ditunjukkan pada Gambar 1.

Hasil ekstraksi DNA dari ketiga jenis buffer tersebut dan hasil ekstraksi DNA dengan menggunakan *extraction kit* dibandingkan dengan cara dielektroforesis dalam gel agarosa (1% dalam TBE buffer) selama 23 menit pada tegangan 100 volt.

Hasil kuantitatif diperoleh dengan *GeneQuant* dengan panjang gelombang

260/280 nm. Data yang diperoleh berupa rasio, konsentrasi DNA (µg/ml) dan protein (mg/ml) dari setiap sampel.

Tingkat kemurnian DNA berkorelasi dengan kualitas DNA. Kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD<sub>260</sub> dan nilai OD<sub>280</sub> pada sampel DNA yang diukur melalui spektrofotometer. DNA dinyatakan murni jika memiliki nilai rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (*optical density*) berkisar antara 1,8–2,0 (Muladno, 2002). Menurut Devereux dan Wilkinson (2004) rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> < 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi fenol atau protein pada hasil ekstraksi. Khosravinia *et al.*, (2007) juga menjelaskan bahwa DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika memiliki rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> > 2,0.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

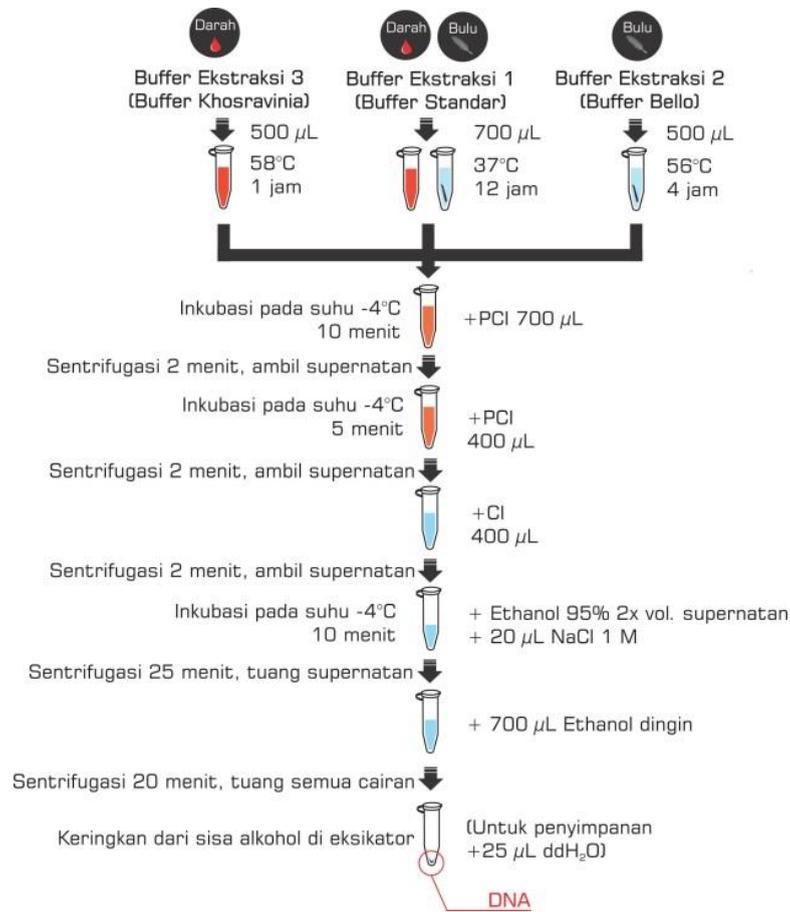
Visualisasi gel elektroforesis hasil ekstraksi DNA (Gambar 2) menunjukkan bahwa ekstraksi dengan metode PCE menggunakan buffer ekstraksi 1, 2 dan 3 sama baiknya jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi menggunakan kit ekstraksi. Hal ini ditunjukkan oleh pita DNA yang tampak jelas pada hasil elektroforesis dari hasil ekstraksi menggunakan buffer ekstraksi 1, 2 dan 3 jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi menggunakan kit ekstraksi.

Pada volume sampel yang sama, konsentrasi DNA hasil ekstraksi menggunakan metode PCE lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi DNA hasil ekstraksi menggunakan *extraction kit*. Namun kadar kontaminan berupa protein dari hasil ekstraksi menggunakan *extraction kit* jauh lebih rendah (Tabel 1, Tabel 2, Tabel 3 dan Tabel 4). Hasil ini menunjukkan kelebihan metode PCE. Selain konsentrasi DNA yang lebih tinggi, biaya yang diperlukan untuk metode PCE lebih murah. Oleh karena itu metode PCE lebih cocok digunakan untuk penelitian yang tidak membutuhkan kemurnian DNA yang tinggi, seperti pemetaan genetik, teknologi marker, dan DNA *sequencing* (Wulandhari, 2009).

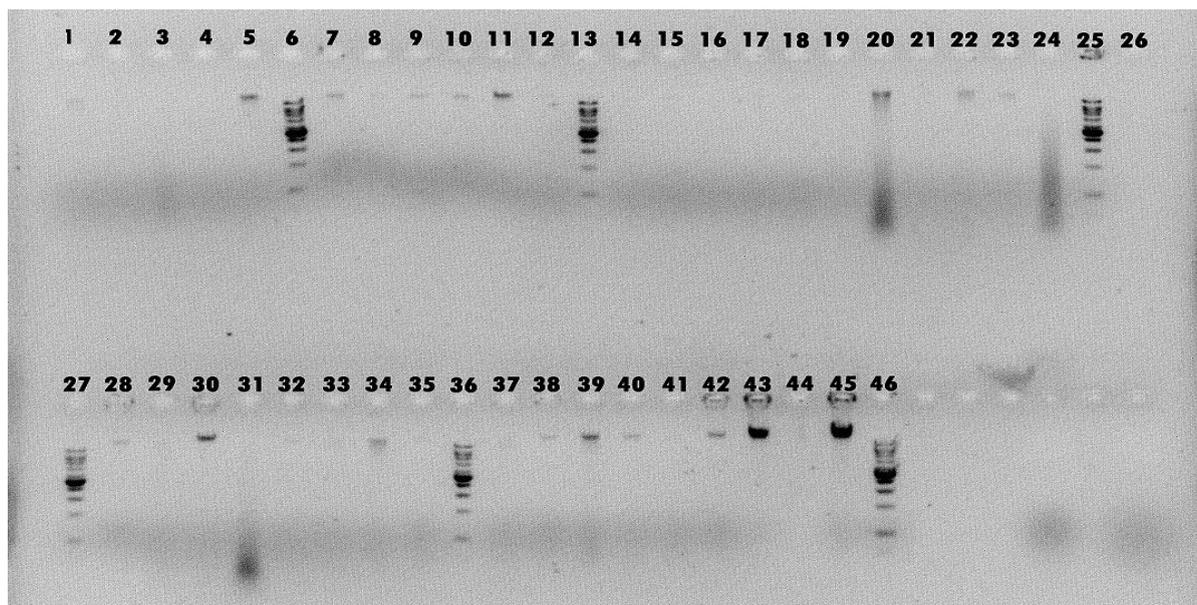
Hasil kuantifikasi DNA (Tabel 1) menunjukkan bahwa sampel QS1 dan QSY2 memiliki rasio yang tinggi (> 2,0). Hasil tersebut mengindikasikan adanya kontaminan RNA pada hasil ekstraksi DNA. Hal ini sesuai

dengan Khosravinia *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika memiliki rasio  $OD_{260}/OD_{280}$  lebih dari 2,0. Sebaliknya, sampel QD1 dan QSY1 memiliki rasio yang rendah, karena konsentrasi DNA-nya juga rendah. Rasio  $OD_{260}/OD_{280}$  sampel QA1 (darah segar)

menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang baik (1,8–2,0). Nilai rasio tersebut menunjukkan *DNEasy Extraction Kit* lebih efektif mengekstraksi sampel darah dibandingkan sampel bulu atau jaringan.



Gambar 1. Tahapan ekstraksi dengan metode PCE



Gambar 2. Visualisasi Hasil Elektroforesis dari Hasil Ekstraksi DNA

Keterangan : *DNEasy Extraction Kit* (1–5); Buffer Ekstraksi 3 (7–12) ; Buffer Ekstraksi 2 (14–24) ; Buffer Ekstraksi 1(28–45) ; *DNA Ladder* (6,13,25,27,36, dan 46).

Tabel 1. Hasil Kuantifikasi Ekstraksi DNA menggunakan *DNEasy Extraction Kit*

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Protein ( $\text{mg/ml}$ )
1	QA1	Darah A <sub>1</sub>	1,886	13,9	0
2	QS1	Bulu sayap	3,040	17,4	0
3	QD1	Bulu dada	0,577	0	0
4	QSY1	Bulu sayap	0,113	0,4	0
5	QSY2	Bulu sayap	2,218	4,3	0

Tabel 2. Hasil Kuantifikasi Ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi 1 (Buffer Standar)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Protein ( $\text{mg/ml}$ )
1	KS	Darah A <sub>1</sub>	1,028	376,4	5,6
2	DS	Darah A <sub>1</sub>	1,021	229,6	3,5
3	A1.4	Darah A <sub>1</sub>	1,549	70,5	0,3
4	A2.4	Darah A <sub>2</sub>	1,158	41,4	0,5
5	A3.4	Darah A <sub>3</sub>	0,957	28,5	0,5
6	A9	Darah A <sub>9</sub>	2,106	32,3	0
7	BD.3	Bulu dada	1,761	33,6	0,1
8	JPa.3	Bulu dada	1,438	52,1	0,3
9	JPb.3	Bulu dada	1,137	124,3	1,5
10	BS.3	Bulu sayap	1,836	295,9	0,5
11	Hpa	Bulu sayap	1,169	149,7	1,7
12	HPb	Bulu sayap	1,342	121,8	1
13	PY2	Bulu sayap	1,702	35,6	0,1

Tabel 3. Hasil Kuantifikasi Ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi 2 (Bello *et al.*, 2001)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Protein ( $\text{mg/ml}$ )
1	BA	Bulu sayap	1,88	199,4	0,2

2	Hba	Bulu sayap	1,149	113,0	1,3
3	HBb	Bulu sayap	1,887	260,0	0,3
4	JBa.3	Bulu dada	1,237	89,4	0,9
5	JBb.3	Bulu dada	1,113	113,6	1,4
6	Mba	Bulu sayap	1,229	23,7	0,5
7	MBb	Bulu sayap	1,477	21,4	0,1
8	Nba	Bulu dada	1,068	41,5	0,6
9	NBb	Bulu dada	1,020	20,8	0,3
10	BY <sub>2</sub>	Bulu sayap	1,791	55,2	0,1
11	BY <sub>2.4</sub>	Bulu sayap	2,236	43,0	0

Tabel 4. Hasil Kuantifikasi Ekstraksi DNA Buffer Ekstraksi 3 (Khosravinia *et al.*, 2007)

No	Kode Sampel	Keterangan	Rasio (260/280)	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Protein (mg/ml)
1	KA1	Darah A1	5,001	43,7	0
2	KA8	Darah A8	10,337	34,7	0
3	a1.4	Darah A1	1,119	136,0	1,7
4	a2.4	Darah A2	1,094	153,5	2
5	a3.4	Darah A3	1,105	131,8	1,7
6	KB5.4	Darah B5	4,275	30,1	0

Berdasarkan data kuantifikasi yang diperoleh, rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> dengan buffer ekstraksi 1 untuk sampel bulu (Tabel 2) tidak jauh berbeda dibandingkan rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> dengan buffer ekstraksi 2 (Tabel 3). Tidak semua sampel yang diekstraksi dengan buffer ekstraksi 1 dan 2 memiliki tingkat kemurnian yang baik. Sebagian besar sampel memiliki rasio kurang dari 1,8 yang berarti terdapat kontaminan berupa protein atau fenol dalam hasil ekstraksi. Sampel BY<sub>2.4</sub> (Tabel 3) memiliki rasio lebih dari 2 yang berarti adanya kontaminan berupa RNA. Hasil ekstraksi dengan tingkat kemurnian yang baik cenderung memiliki konsentrasi DNA yang tinggi pula dan kadar protein (kontaminan) yang rendah. Kemampuan kedua buffer ekstraksi tersebut tidak jauh berbeda dalam mengekstraksi DNA, namun proses ekstraksi dengan buffer ekstraksi 2 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih singkat dibandingkan buffer ekstraksi 1.

Rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> dengan buffer ekstraksi 1 untuk sampel darah (Tabel 2) maupun buffer ekstraksi 3 (Tabel 4) menunjukkan tingkat kemurnian yang kurang baik. Besar kemungkinan terjadi kontaminasi oleh fenol (rasio < 1,8), karena kadar protein (pengotor) yang terukur rendah dan nilai rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> juga rendah. Selain fenol, RNA

juga merupakan kontaminan yang menyebabkan rasio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> tinggi (> 2,0).

Buffer ekstraksi 3 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih cepat ( $\pm$  1 jam) dibandingkan dengan buffer ekstraksi 1 ( $\pm$  18 jam). Hal ini dikarenakan kandungan SDS dan EDTA dalam buffer ekstraksi 3 cukup tinggi, sehingga proses lisisnya sel dapat terjadi lebih efektif.

Berdasarkan data kuantifikasi yang diperoleh, sumber material genetik yang paling baik digunakan adalah sampel bulu sayap. Konsentrasi DNA dari sampel bulu sayap cenderung tinggi dibandingkan DNA dari sampel lainnya (darah dan bulu dada). Selain itu kadar kontaminan (protein) juga cenderung rendah, baik pada metode ekstraksi dengan kit maupun metode PCE.

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode PCE lebih efisien dibandingkan metode *extraction kit*. Buffer ekstraksi 2 lebih efisien untuk mengekstrak DNA dari sampel bulu, sedangkan buffer ekstraksi 3 untuk sampel darah. Sumber material genetik yang lebih baik digunakan adalah sampel bulu sayap.

Data mengenai ekstraksi DNA burung walet dari sumber material genetik lain belum dioptimalisasi, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai ekstraksi DNA dengan metode *phenol chloroform extraction* dari sumber material genetik lain, seperti sisa cangkang telur dan feses. Selain itu, perlu dilakukan penambahan RNase pada tahap ekstraksi DNA untuk hasil yang lebih murni atau untuk penelitian yang membutuhkan kemurnian hasil ekstraksi DNA yang tinggi. Penelitian molekuler selanjutnya yang menggunakan burung (*Collocalia fuchiphaga*) sebagai objek penelitiannya, disarankan menggunakan sampel bulu sayap sebagai sumber material genetik, karena selain lebih mudah didapat, pengambilan bulu lebih tidak menyakitkan dibandingkan pengambilan sampel darah (*non-invasive sampling*).

Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analysis. *Canadian Journal of Zoology*. 69: 82-90.

Wulandhari, A. 2009. Optimalisasi Hasil Ekstraksi DNA dari Darah Segar Sapi Menggunakan *High Salt Method* dengan Perbandingan Darah dan *Lysis Buffer* pada Kecepatan Sentrifugasi Berbeda. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

## 5. REFERENSI

- Adiwicaksana. 2006. Pengelolaan Sarang Burung Walet Di Taman Nasional Betung Kerihun Propinsi Kalimantan Barat. *Skripsi*. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bello, N., O. Francino, & A. Sanchez. 2001. Isolation of Genomic DNA from Feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13 (2): 162-164.
- Devereux, R. & S.S. Wilkinson. 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Khosravinia, H., H.N.N. Murthy, D.T. Parasad, & N. Pirany. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6 (4): 481-486.
- Mardiastuti, A., Y.A. Mulyani, J. Sugarjito, L.N. Ginoga, I. Maryanto, A. Nugraha & Ismail. 1998. *Teknik Pengusahaan Walet Rumah, Pemanenan Sarang dan Penanganan Pasca Panen*. Laporan Riset Bidang Teknologi Perlindungan Lingkungan. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Seutin, G., B.N. White, dan P.T. Boag. 1991.