



Modifikasi Metode Ekstraksi DNA pada Susu Pasteurisasi

Modification of DNA Extraction Methods in Pasteurized Milk

Kamaliah^{1*},

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Ar-Raniry, Banda Aceh, Indonesia 23111

INFO ARTIKEL

Diterima: Maret 2018

* email korespondensi:
dyahelmy@gmail.com

Kata kunci:
Metode ekstraksi DNA
Susu pateurisasi
Gen *D-Loop*

Keywords:
DNA extraction Method
Pasteurized milk
D-Loop gene

ABSTRAK

Modifikasi metode ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan kualitas dan kuantitas DNA yang tinggi. Penelitian ini menggunakan Metode Ekstraksi DNA KIT prosedur *fresh blood* dimodifikasikan dengan Metode *Salting Out* (NaCl) pada tahap awal pengenceran sampel. Pengenceran dilakukan berdasarkan perbandingan volume susu dan NaCl (1:0; 1:1; dan 1:3). Tujuan penelitian ini untuk membandingkan metode perbandingan volume susu dan NaCl yang dapat memunculkan pita DNA paling tebal. Gen *D-loop* diamplifikasi secara *in vitro* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil amplifikasi gen *D-loop* pada gel elektroforesis poliakrilamid (PAGE 6%) menunjukkan bahwa perbandingan volume susu dan NaCl 1:0 menghasilkan pita DNA paling tebal.

ABSTRACT

Modification of DNA extraction method is carried out to obtain high quality and quantity DNA. This research used DNA Extraction KIT Method procedur for fresh blood modified by Salting Out (NaCl) Method at the first step of sample dilution. Dilution in this method based on the ratio of milk and NaCl volume (1: 0; 1: 1; and 1: 3). The aims of this study was to compare ratio milk and NaCl volume that showed the thick DNA band. D-loop gene was amplified by *in vitro* using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The results amplification of D-loop gene on polyacrylamide electrophoresis gel (PAGE 6%) showed that the thickest DNA band on ratio 1:0.

1. Pendahuluan

Perbandingan metode ekstraksi DNA menggunakan sampel susu semakin diteliti dan dibandingkan agar dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas DNA (Pokorska *et al.*, 2016). Metode ekstraksi DNA yang dianggap efektif dan efisien adalah metode yang dapat menghasilkan konsentrasi DNA yang tinggi, membutuhkan biaya relatif murah, dapat dilakukan dalam jangka waktu yang singkat, sampel mudah diperoleh, serta menggunakan bahan kimia dan sampel dengan volume yang sedikit. Metode ekstraksi DNA yang umum digunakan untuk mengisolasi DNA dari susu adalah Metode Ekstraksi *Phenol-Chloroform*, *Salting Out*, dan Komersial KIT. Metode Ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dari segi harga paling murah jika

dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, tetapi membutuhkan waktu yang lama dan larutan yang digunakan merupakan penghambat PCR (Volk *et al.*, 2014; Demeke & Jenkins 2009). Metode *Salting Out* merupakan metode yang tidak mengandung larutan penghambat PCR, mudah digunakan, dan membutuhkan harga yang relatif lebih murah (Lopera-Barrero *et al.*, 2008). Metode Komersial KIT membutuhkan waktu yang lebih cepat dan lebih mudah digunakan, tetapi relatif lebih mahal (Kamaliah 2018).

Modifikasi metode ekstraksi DNA pada susu menentukan peningkatan konsentrasi DNA yang dihasilkan. Modifikasi Metode Ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dengan Metode Komersial KIT menghasilkan konsentrasi DNA lebih tinggi dibandingkan dengan

menggunakan Metode *Phenol-Chloroform* tanpa modifikasi, namun modifikasi Metode Ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dan Metode Komersial KIT membutuhkan waktu yang lebih lama jika dibandingkan dengan metode ekstraksi tanpa modifikasi (Usman *et al.*, 2014). Modifikasi Metode Komersial KIT dengan Metode *Salting Out* belum pernah dilakukan. Keunggulan Metode Komersial KIT dan *Salting Out* sama-sama membutuhkan waktu yang cepat. Prosedur Metode Komersial KIT sangat mudah digunakan. Metode *Salting Out* menggunakan NaCl untuk membersihkan sel dari faktor penghambat PCR. Susu mengandung lemak, protein, dan ion kalsium sebagai faktor penghambat PCR (Azad & Ahmed 2016; Feligini *et al.*, 2005; Schrader *et al.*, 2012).

Susu merupakan sumber DNA yang mudah diperoleh dan dapat digunakan dalam jumlah volume yang sedikit. Penggunaan volume susu sebagai sumber DNA dari 1 ml hingga 100 ml secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap tingkat konsentrasi DNA yang dihasilkan (Volk *et al.*, 2014). Konsentrasi DNA pada susu ditentukan oleh jumlah sel somatik yang mengandung lebih dari 17×10^6 sel dengan jumlah DNA di dalam sel sebanyak 11-100 µg (Lipkin *et al.*, 1993). Pada penelitian ini menggunakan modifikasi metode ekstraksi DNA antara Komersial KIT dan NaCl untuk mengisolasi DNA dari susu dengan membandingkan tiga perbandingan volume susu dan NaCl (1:0, 1:1, 1:2).

2. Metodologi Penelitian

Tempat Penelitian dan Sampel

Penelitian ini dilaksanakan di bagian Fungsi Hayati dan Prilaku Hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Sampel yang digunakan adalah susu pasteurisasi berasal dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Metode Ekstraksi DNA Modifikasi Komersial KIT dan NaCl

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan produk komersial KIT (Geneaid) prosedur *fresh blood*. Penelitian ini menggunakan NaCl 0,9% sebagai larutan suspensi. Pada tahap awal suspensi digunakan tiga perbandingan volume NaCl dan susu (Tabel 1).

Tabel 1. Perbandingan Volume Susu dan NaCl

Perbandingan Susu dan NaCl	Volume (ml)	
	Susu	NaCl
1:0	14	0
1:1	7	7
1:3	3	11

Setelah sampel diencerkan kemudian dilakukan sentrifugasi pada 13000 rpm selama 10 menit. Dilakukan pengenceran 0,9 % NaCl 2x setengah dari

volume awal dan disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Tahapan metode ekstraksi DNA komersial KIT (Geneaid) dilakukan mengikuti prosedur dari perusahaan.

Amplifikasi

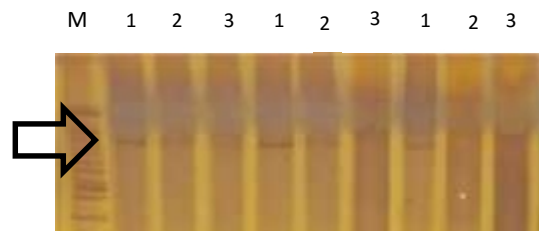
Amplifikasi gen *D-loop* menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (Takara PCR Thermal Cycler MP4). Pasangan primer yang digunakan adalah AF22-F: 5'- GCG TAC GCA AAT CCT ACG ATC A-3' dan AF23-R: 3'- ATG CAG TTA AGT CCA GCT AC -5'. Total volume PCR 20 µl terdiri dari 0.8 µl masing-masing primer *forward* dan primer *revers*, 2 µl cetakan DNA, dan 10 µl Taq DNA *Polymerase Ready Mix* (Kappa 0.05 U / ml, 25 mM Mg polymerase buffer, dan masing-masing dNTP 4 mM). Kondisi amplifikasi gen *D-loop* yang digunakan adalah tahap denaturasi pada 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 58°C selama 1 menit 30 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap akhir elongasi pada suhu 72°C selama 7 menit.

Visualisasi DNA

Visualisasi produk amplifikasi gen *D-loop* dimigrasikan menggunakan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE 6%) 200 volt selama 50 menit. Konsentrasi bufer yang digunakan adalah 1x TBE (Tris-HCl 0,5; Asam Borat 0,65; EDTA 0,02 M). Visualisasi yang dilakukan menggunakan pewarnaan perak (Byun *et al.*, 2009).

3. Hasil Dan Pembahasan

Visualisasi amplifikasi gen *D-loop* pada gel elektroforesis menunjukkan pita DNA dengan ukuran sebesar 800 pb (Gambar 1). Perbandingan susu dan NaCl 1:0 memperlihatkan pita yang paling tebal dibandingkan dengan perbandingan susu dan NaCl 1:1 dan 1:3. Perbandingan susu dan NaCl 1:0 menunjukkan pita tunggal, sedangkan perbandingan susu dan NaCl 1:1 menunjukkan pita DNA sangat tipis, dan perbandingan 1:3 tidak terlihat pita DNA. Ketiga pengulangan menunjukkan hasil yang sama. Amplifikasi PCR tidak menunjukkan pita non spesifik, namun kontaminan masih terlihat pada gel.



Gambar 1. Perbandingan Volume Susu dan NaCl dengan Tiga Pengulangan. (1) Perbandingan 1:0, (2) Perbandingan 1:1, (3) Perbandingan 1:2

Modifikasi Metode Ekstraksi DNA Komersial KIT prosedur *fresh blood* dengan Metode NaCl dapat digunakan. Pada tahap awal ekstraksi sampel susu tidak

perlu diencerkan menggunakan NaCl sehingga pita DNA muncul pada gel elektroforesis. Tetapi pada tahap selanjutnya pengenceran sampel susu menggunakan NaCl perlu dilakukan untuk memperoleh sel epitel ambing, yaitu dengan jumlah volume NaCl setengah dari volume awal sampel susu. Metode Komersial KIT prosedur *fresh blood* perlu dimodifikasikan dengan NaCl untuk memurnikan DNA di dalam susu dari komposisi susu lainnya seperti lemak, protein, dan kalsium (Azad & Ahmed 2016; Feligini *et al.*, 2005; Lopera-Barrero *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2002). Lemak, protein, dan ion kalsium merupakan faktor penghambat PCR (Schrader *et al.*, 2012).

Perbedaan visualisasi pita DNA yang dihasilkan pada ketiga perbandingan susu dan NaCl kemungkinan bukan karena perbedaan volume susu tetapi karena perbedaan prosedur ekstraksi DNA yang digunakan, yaitu pada tahap pengenceran susu menggunakan NaCl. Volume susu 1 ml sampai dengan 100 ml secara statistik tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap jumlah konsentrasi DNA yang dihasilkan (Volk *et al.*, 2014). Konsentrasi DNA pada susu ditentukan oleh jumlah sel somatik yang mengandung lebih dari 17×10^6 sel dengan jumlah DNA di dalam sel sebanyak 11-100 μg (Lipkin *et al.*, 1993).

Perbandingan metode ekstraksi DNA non-komersial, komersial KIT, dan modifikasi menghasilkan kualitas pita DNA yang berbeda pada sampel susu sebagai sumber DNA. Metode ekstraksi DNA modifikasi antara Metode *Phenol-Chloroform* dengan Komersial KIT menghasilkan kualitas DNA lebih tinggi daripada menggunakan Metode *Phenol-Chloroform* tanpa modifikasi, tetapi metode modifikasi membutuhkan harga sedikit lebih mahal (Usman *et al.*, 2014). Berbeda dengan yang dilaporkan Volk *et al.*, 2014, metode ekstraksi DNA menggunakan Metode *Phenol-Chloroform* menghasilkan konsentrasi DNA lebih tinggi daripada Metode Modifikasi *Phenol-Chloroform* dengan Komersial KIT. Keberhasilan isolasi DNA menggunakan Metode *Phenol-Chloroform* juga dipengaruhi oleh persiapan bahan ekstraksi yang dilakukan oleh laboran (Volk *et al.*, 2014). Metode Komersial KIT berhasil digunakan untuk isolasi DNA dari susu sterilisasi, susu segar, susu produk campuran kambing dan susu sapi, susu bubuk, susu UHT, dan produk olahan susu (Dabrowska *et al.* 2010; Jung *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2017; Maskova & Paulickova 2006).

4. Kesimpulan

Perbandingan volume susu dan NaCl pada metode ekstraksi DNA modifikasi Komersial KIT prosedur *fresh blood* dan *Salting Out* dapat disimpulkan bahwa perbandingan 1:0 memperlihatkan pita DNA yang lebih jelas daripada perbandingan 1:1 dan 1:3. Pengenceran sampel susu pasteurisasi tidak disarankan untuk tahap awal, tetapi pada tahap selanjutnya disarankan untuk dilakukan pengenceran menggunakan NaCl 2x volume awal sampel susu untuk memperoleh sel epitel ambing yang murni.

5. Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam penelitian ini di laboratorium bagian Fungsi Hayati dan Prilaku Hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

6. Daftar Pustaka

- Azad, T., and Ahmed, S. 2016. Common Milk Adulteration and Their Detection Techniques. *International Journal of Food Contamination* 22 (3): 2-9.
- Byun, S.O., Fang, Q., Zhou H, and Hickford, J.GH. 2009. An Effective Method for silver-staining DNA in Large Numbers of polyacrilamid gels. *Anal Biochem* 385:174-175.
- Dabrowska, A., Walecka, E., Bania, J., Zelazko, M., Szoltysik, M., and Chrzanowska, J. 2010. Quality of UHT Goat's Milk in Poland Evaluated by Real-Time PCR. *Small Ruminant Research* 94: 32-37.
- Demeke, T., and Jenkins, G. R. 2009. Influence of DNA Extraction Methods, PCR Inhibitors and Quantification Methods on Real-time PCR Assay of Biotechnology-Derived Traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* DOI 10.1007/s00216-009-3150-9.
- Feligini, M., Frati, S., Curik, V.C, Brambilla, A., Parma, P., Curik, I., Greppi, F.G., and Enne, G. 2005. Caprine a-Casein Polymorphism: Characterisation of A, B, E and F Variants by Means of Various Biochemical and Molecular Techniques. *Food Technol. Biotechnol* 43 (2): 123-132.
- Jung, Y. K., Jhon, D. Y., Kim, K., and Hong, Y. H. 2011. Quantitative Detection of Cow Milk in Goat Milk Mixtures by Real-Time PCR. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour* 31 (6): 827-833.
- Kamaliah. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dan *Kit Extraction* pada Sapi Aceh dan Sapi Madura. *Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi dan Kependidikan* 5 (1): 60-65.
- Liao, J., Yang, L., Sheppard, A. M., and Liu, Y. F. 2017. Comparison of DNA Quality in Raw and Reconstituted Milk During Sterilization. *J. Dairy Sci.* 101:147-153.
- Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M., and Friedmann, A. 1993. Milk as a Source of Deoxyribonucleic Acid and as a Substrate for the Polymerase Chain Reaction. *J Dairy Sci* 76: 2025-2032.
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., and Lopes, T. D. S. 2008. Comparison of DNA Extraction Protocols of Fish Fin and Larvae Samples: Modified Salt (NaCl) Extraction. *Ciencia e Investigacion Agraria* 35(1): 65-74.
- Maskova, E., and Paulickova, I. 2006. PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.* 24(3): 127-132.

- Miranda, G., Mahe, M. F., Leroux, C., and Martin, P. 2004. Proteomic Tools to Characterize the Protein Fraction of *Equidae* Milk. *Proteomics* 4: 2496–2509.
- Murphy, M. A., Shariflou, M. R., and Moran, C. 2002. High Quality Genomic DNA Extraction from Large Milk Samples. *Journal of Dairy Research* 69: 645-649.
- Pokorska, J., Kulaj, D., Dusza, M., Zychlinska-Buczek, J and Makulska, J. 2016. New Rapid Method of DNA Isolation from Milk Somatic Cells. *Animal Biotechnology* 27 (2): 113-117.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. 2012. PCR Inhibitors – Occurrence, Properties and Removal. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014-1026.
- Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Fan, Z., and Wang, Y. 2014. Comparison of Methods for High Quantity and Quality Genomic DNA Extraction from Raw Cow Milk. *Genetics and Molecular Research Journal* 13 (2): 3319-3328.
- Volk, H., Piskernik, S., Kurincic, M., Klančnik, A., Toplak, N., Jersek, B. 2014. Evaluation of Different Methods for DNA Extraction from Milk. *Journal of Food and Nutrition Research* 53(2): 97–104.