

Artikel Penelitian

Isolasi DNA pada Produk Otak-Otak Ikan Bandeng

Sri Utaminingsih¹, Sofia Dyah Utami², Alfi Sophian³

^{1,2,3}Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta, Indonesia

*Corresponding author: sri.utami@pom.go.id

ABSTRACT

Background: Analysis of the quality of isolated DNA is an analytical technique used to determine the quality of isolated DNA to minimize the failure of the amplification process in molecular analysis. **Purposes:** The purpose of this study was to see the quality of DNA isolated from processed fish food products in the form of milkfish brains. **Methods:** The DNA extraction procedure followed the manual extraction kit protocol used. Analysis of the quality of the isolated DNA was measured using a nanophotometer, where the quality analysis was based on the value of the concentration and purity of the isolated DNA. Data analysis was carried out using the average test of concentration and purity values. **Results:** Based on the results of the analysis of DNA quality, it was obtained that the concentration of DNA was in the range of 9.6 – 18.5 with the average value of isolated DNA at 13.4 ng/μL, while the purity value read at wavelength A260/A28 was in the range 1.64 – 1.87, with the average value, is at a value of 1.79. **Conclusion:** The results of the study concluded that the DNA isolated from the processed food product samples of milkfish brains showed the concentration and purity values that were included in the category of good DNA isolation results.

Keywords: analysis, DNA, extraction, concentration, food

ABSTRAK

Latar belakang: Analisis mutu DNA hasil isolasi merupakan teknik analisis yang digunakan untuk mengetahui kualitas DNA hasil isolasi sehingga meminimalkan kegagalan proses amplifikasi dalam analisis molekuler. **Tujuan:** Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk melihat mutu DNA hasil isolasi pada produk pangan olahan ikan berupa otak-otak ikan bandeng. Prosedur ekstraksi DNA mengikuti protokol ekstraksi manual kit yang digunakan. Analisis mutu DNA hasil isolasi diukur menggunakan nanophotometer, dimana analisis mutu berdasarkan nilai konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi. Analisis data dilakukan menggunakan uji rata-rata nilai konsentrasi dan kemurnian. **Hasil:** Berdasarkan hasil analisis mutu DNA diperoleh hasil konsentrasi DNA berada pada kisaran 9.6 – 18.5 dengan nilai rata-rata DNA hasil isolasi berada pada nilai 13.4 ng/μL, sedangkan nilai kemurnian yang dibaca pada panjang gelombang A260/A28 berada pada kisaran 1.64 – 1.87, dengan nilai rata-rata berada pada nilai 1.79. **Simpulan:** Sehingga dapat disimpulkan bahwa DNA hasil isolasi yang dilakukan pada sampel produk pangan olahan otak-otak ikan bandeng menunjukkan nilai konsentrasi dan kemurnian yang masuk dalam kategori hasil isolasi DNA yang baik.

Kata kunci: analisis, DNA, ekstraksi, konsentrasi, makanan

PENDAHULUAN

Analisis mutu DNA hasil isolasi merupakan teknik analisis yang digunakan untuk mengetahui kualitas DNA hasil isolasi sehingga meminimalkan kegagalan proses amplifikasi dalam analisis molekuler. Beberapa penyebab kegagalan dalam melakukan analisis molekuler adalah adanya inhibitor pada DNA hasil isolasi atau nilai konsentrasi DNA yang diisolasi sangat sedikit sehingga mempengaruhi kinerja PCR dalam melakukan proses amplifikasi (1,2).

Pengujian biologi molekuler pada produk makanan berbasis spesies hewan merupakan teknik pengujian yang dapat berkembang dari penelitian DNA spesies pada bidang biologi molekuler (3). Oleh sebab itu, penelitian ini dapat menjadi hal baru yang dapat berkembang untuk pengujian mutu produk dari ancaman pemalsuan klaim bahan baku. Diperlukan banyak informasi pendahuluan yang akan digunakan sebagai sumber acuan untuk mendukung perkembangan metode pengujian DNA spesies pada produk pangan dan hasil olahannya. Penelitian tentang analisis mutu isolasi DNA pernah dilakukan oleh (4), dalam penelitiannya untuk uji penelusuran beberapa varian produk tomat.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk melihat mutu DNA hasil isolasi pada produk pangan olahan ikan yaitu otak-otak ikan bandeng, sehingga hasil penelitian ini dapat menyumbang peran dalam perkembangan pengujian bidang molekuler untuk uji identifikasi DNA spesies atau uji autentifikasi produk berbasis uji biologi molekuler.

METODE

Material

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk pangan olahan ikan berupa otak-otak ikan bandeng, kit ekstraksi DNeasy Mericon Food [Qiagen].

Prosedur Ekstraksi DNA

Timbang sampel seberat 200 mg dalam tabung mikrosentrifus 2 ml, kemudian ditambahkan 700 μ L *lysis buffer* dan 30 μ L Proteinase K, kemudian diinkubasi pada suhu 70 °C selama 30 menit. Keluarkan sampel dari inkubasi kemudian lanjutkan dengan centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan putaran centrifuge 14.000 rpm. Dalam tabung sentrifus akan terbentuk 2 lapis pelet dan supernatan, ambil supernatan dengan cara dipipet dan pindahkan ke tabung sentrifus 2 mL kemudian buang pelet dalam tabung. Pada supernatan dalam tabung sentrifus 2 mL ditambahkan 350 μ L kloroform kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 14.000 rpm, kemudian dipipet larutan yang berada di lapisan atas ke dalam tabung sentrifus 2 mL yang baru dan ditambahkan 750 μ L *binding buffer* PB dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar.

Vortex kemudian memasukkan semua cairan ke dalam tabung centrifuge 2 ml secara bertahap sampai habis ke dalam spin column dan centrifuge. Setelah semua cairan habis, masukkan dan centrifuge, lalu tambahkan 500 μ L wash buffer AW2 dan centrifuge lagi selama 1 menit dengan kecepatan putaran 14.000 rpm. Pindahkan spin column ke dalam tabung sentrifus baru 1,5 mL kemudian tambahkan 70 μ L elution buffer (EB) kemudian sentrifus dengan

kecepatan putaran 14.000 rpm selama 1 menit. Buang spin column dan sisa cairan dalam tabung centrifuge 1,5 mL merupakan DNA hasil isolasi yang akan diukur kemurnian dan konsentrasinya sebelum digunakan.

Analisis Mutu DNA

Analisis mutu DNA hasil isolasi diukur menggunakan nanophotometer, dimana analisis mutu berdasarkan nilai konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi (1,5,6). Konsentrasi DNA yang menunjukkan hasil isolasi DNA yang baik jika nilai konsentrasi lebih besar dari 20 ng/ μ L, sedangkan nilai kemurnian diukur pada panjang gelombang A260/A280 berada pada rentang nilai 1.7-2.1 (7-9).

Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan uji rata-rata nilai konsentrasi dan kemurnian, yang didapat dari pengukuran menggunakan nanophotometer (3,5,10,11).

HASIL

Berdasarkan hasil analisis mutu DNA yang dibaca menggunakan nanophotometer, diperoleh hasil konsentrasi DNA berada pada kisaran 9.6 – 18.5 dengan nilai rata-rata DNA hasil isolasi berada pada nilai 13.4 ng/ μ L, sedangkan nilai kemurnian yang dibaca pada panjang gelombang A260/A28 berada pada kisaran 1.64 – 1.87, dengan nilai rata-rata berada pada nilai 1.79. Data lengkap, seperti disajikan pada tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Hasil isolasi DNA

No.	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (A260/A280)
1	14.3	1.72
2	13.7	1.84
3	18.5	1.75
4	11.6	1.87
5	11.4	1.87
6	17.7	1.73
7	15.9	1.82
8	13.8	1.80
9	11.3	1.78
10	15.9	1.64
11	11.6	1.77
12	11.3	1.84
13	14.8	1.85
14	10.3	1.77
15	9.6	1.79
Average	13.4	1.79

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan diperoleh nilai konsentrasi dengan rata-rata 13,4 ng/ μ L dan nilai kemurnian yang dibaca pada panjang gelombang A260/A80 berada pada nilai 1,79. Hasil ini merupakan hasil isolasi DNA yang masuk dalam kategori hasil isolasi DNA yang baik. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (1,12), yang menyatakan bahwa isolasi DNA yang baik jika konsentrasi DNA hasil isolasi lebih besar dari 10 ng/ μ L dan nilai kemurnian berada pada rentang 1,7-2.

Proses ekstraksi pada sampel produk olahan pangan memiliki poin penting yang harus diperhatikan yaitu pada sampel produk makanan, kemungkinan DNA yang ada pada sampel akan terfragmentasi oleh proses pemanasan, disamping itu pula, pada matrik produk makanan perlu diperhatikan adanya komposisi bahan yang digunakan. Adanya inhibitor dalam proses ekstraksi DNA akan sangat berpengaruh terhadap kualitas mutu DNA yang dihasilkan. Hasil isolasi DNA menunjukkan semua sampel yang diuji dalam penelitian ini menunjukkan nilai kemurnian dan konsentrasi DNA yang masuk dalam kategori DNA yang baik.

Menurut Gryson (13), proses pemasakan pada sebuah produk tidak mempengaruhi mutu DNA hasil isolasi sebuah produk. Oleh sebab itu, pada pengujian DNA spesies yang menggunakan teknik biologi molekuler berbasis *Real-Time* PCR, isolasi DNA merupakan tahapan paling penting. Keberhasilan sebuah proses isolasi akan mendukung keberhasilan proses selanjutnya.

Pada proses ekstraksi DNA, enzim proteinase K memiliki peran yang cukup penting, dimana enzim ini bekerja dengan cara menghancurkan protein kemudian mencernanya. Penggunaan teknik ini dianggap lebih efektif jika dibandingkan dengan metode yang menggunakan bahan kimia, hal ini karena enzim bekerja cukup efektif langsung menargetkan ikatan asam amino dalam melisis protein. Enzim proteinase K aktif bekerja pada suhu 65-70°C, sehingga pada beberapa penelitian yang menggunakan metode ini terkadang perlu melakukan optimasi metode sebelum menggunakannya (14,15). Tujuan dari

proses pemanasan ini adalah mengaktivasi enzim proteinase K agar dapat aktif bekerja untuk melakukan lisis (16).

Dalam melakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan kloroform, fungsi pelarut ini berperan dalam meningkatkan densitas fase organik, mencegah fenol dari inverting ke dalam fase air, yang mungkin terjadi tanpa menggunakan kloroform karena kepadatannya yang dekat air. Oleh karena itu, fungsi kloroform dapat digunakan untuk menjaga DNA dari proses terdegradasi oleh fenol (17).

Sistem ekstraksi yang umumnya menggunakan Phenol-Chloroform bekerja dengan cara menggunakan fenol sebagai pengikat protein, lemak dan karbohidrat, yang selanjutnya akan dipisahkan dengan makromolekul lainnya. Pada saat dilakukan sentrifugasi, makromolekul seperti protein dan polisakarida yang diikat oleh Phenol dan Chloroform Isoamil Alkohol akan mengendap di dasar tabung, sedangkan DNA dan air berada di lapisan atas (18). Cara yang dapat dilakukan untuk memisahkan memurnikan DNA tersebut adalah dengan *centrifuge kolom*, dimana pada akhir setelah proses pencucian dengan menggunakan alkohol sehingga sisa garam dan fenol yang terdapat pada sampel akan keluar dan meninggalkan pelet DNA. Elusi untuk proses penarikan pelet DNA dari spin kolom ini dapat menggunakan aquades steril atau nukleotida *free water* (19,20).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa DNA hasil isolasi yang dilakukan pada sampel produk pangan olahan otak-otak ikan bandeng

menunjukkan nilai konsentrasi dan kemurnian yang masuk dalam kategori hasil isolasi DNA yang baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan atas dukungan laboratorium pengujian yang digunakan dalam penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan, dan tidak ada afiliasi atau hubungan dengan atau dengan entitas atau organisasi mana pun, yang dapat menimbulkan pertanyaan bias dalam diskusi dan kesimpulan dari naskah.

REFERENSI

- Sophian A. DNA Isolation of Chicken Feathers from the Base of the Young Feathers, the Base of the Old Feathers, and the Tip of the Feathers. *Bioeduscience* [Internet]. 2021 Aug 31;5(2):104–8. Available from: <https://journal.uhamka.ac.id/index.php/bioeduscience/article/view/6211>
- Sutanta M, Wulan DT, Nabila Y, Sophian A. Application of Double Wash Technique for Species DNA Isolation in Soft Capsule Shell Samples: Application of Double Wash Technique for Species DNA Isolation in Soft Capsule Shell Samples. *Erud Indones J Food Drug Saf* [Internet]. 2022 May 24;2(1 SE-Articles):14–9. Available from: <https://eruditio.pom.go.id/index.php/home/article/view/78>
- Sophian A. Detection of Species DNA in Chicken Meatball Products Using NGF Genes as Molecular Markers. *BiosciED J Biol Sci Educ*. 2021;2(2):47–51.
- Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli M, Marmiroli N. Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control* [Internet]. 2010 Feb;21(2):143–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509001418>
- Sophian A. Short Communication: Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Asian J Nat Prod Biochem*. 2021;19(1).
- Piskata Z, Servusova E, Babak V, Nesvadbova M, Borilova G. The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules* [Internet]. 2019 Mar 26;24(6):1188. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1188>
- Piskata Z, Pospisilova E, Borilova G. Comparative study of DNA extraction methods from fresh and processed yellowfin tuna muscle tissue. *Int J Food Prop* [Internet]. 2017 Dec 18;20(sup1):S430–43. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1297953>
- Aliyu R., Wasuu AA, Dangora D., Ademola JO, Adamu A. Comparative study of genomic DNA extraction protocols in rice species . *Int J Adv Res Technol*. 2013;2(2):1–

- 3.
9. Branquinho MR, Ferreira RTB, Cardarelli-Leite P. Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. *Food Sci Technol*. 2012;32(1):112–8.
10. Wulan DTRI, Sutanta M, Sophian A. Short Communication : Comparison of two commercial DNA extraction kit to obtain high quality porcine DNA. *Asian J Trop Biotechnol*. 2021;18(2):69–72.
11. Sophian A. Species DNA Detection Using PGR Gene Genetic Markers in Chicken Nuggets: Species DNA Detection Using PGR Gene Genetic Markers in Chicken Nuggets. *Indones Food Sci & Technol J [Internet]*. 2021 Dec 31;5(1 SE-):17–20. Available from: <https://online-journal.unja.ac.id/iftj/article/view/14618>
12. Sophian A, Sri U, Sofia UD. DNA isolation in processed chicken meat products (nugget) using modified DNeasy Mericon Food kit (Qiagen). 2022;12(2):15–21.
13. Gryson N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Mar;396(6):2003–22.
14. Sophian A, Syukur A. Analysis of Purity and Concentration of Isolated DNA in Making Raw DNA of Rat Species. *Erud Indones J Food Drug Saf*. 2021;1(2):1–5.
15. Sophian A. Short Communication: Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Asian J Nat Prod Biochem [Internet]*. 2021 Mar 5;19(1). Available from: <https://smujo.id/jnpb/article/view/6779>
16. Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, McVeigh MM, Lodge DM. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol Ecol Resour*. 2015 Jan;15(1):168–76.
17. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem*. 1974 Aug;47(1):91–7.
18. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*. 1981 Mar;145(3):1365–73.
19. Qiagen. DNeasy® Mericon® Food Handbook. For extraction of total nucleic acids from a range of food sample types. Vol. 06. 2014. 18–19 p.
20. Matlock B, Scientific TF, Wilmington M. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note 52646. USA; 2015.