



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

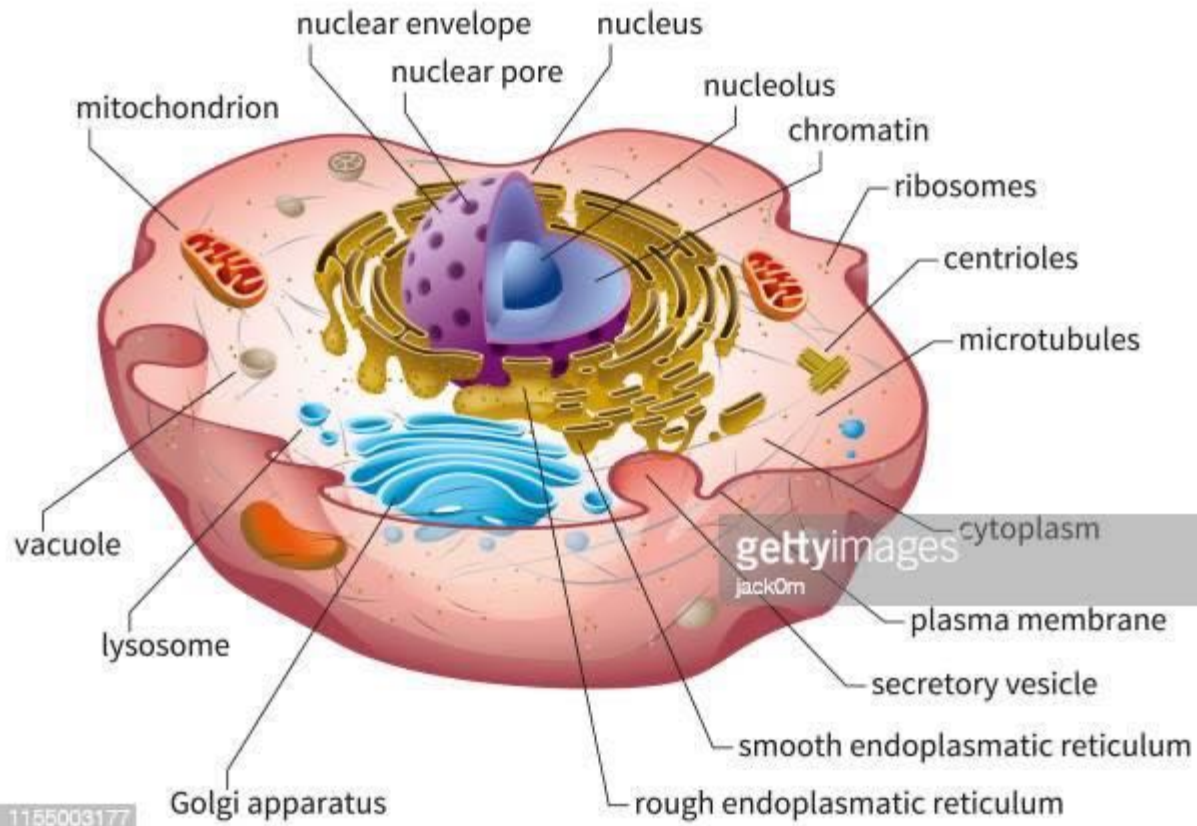


ISOLASI DNA

Rini Widayanti
LPPT 31 Okt 2023

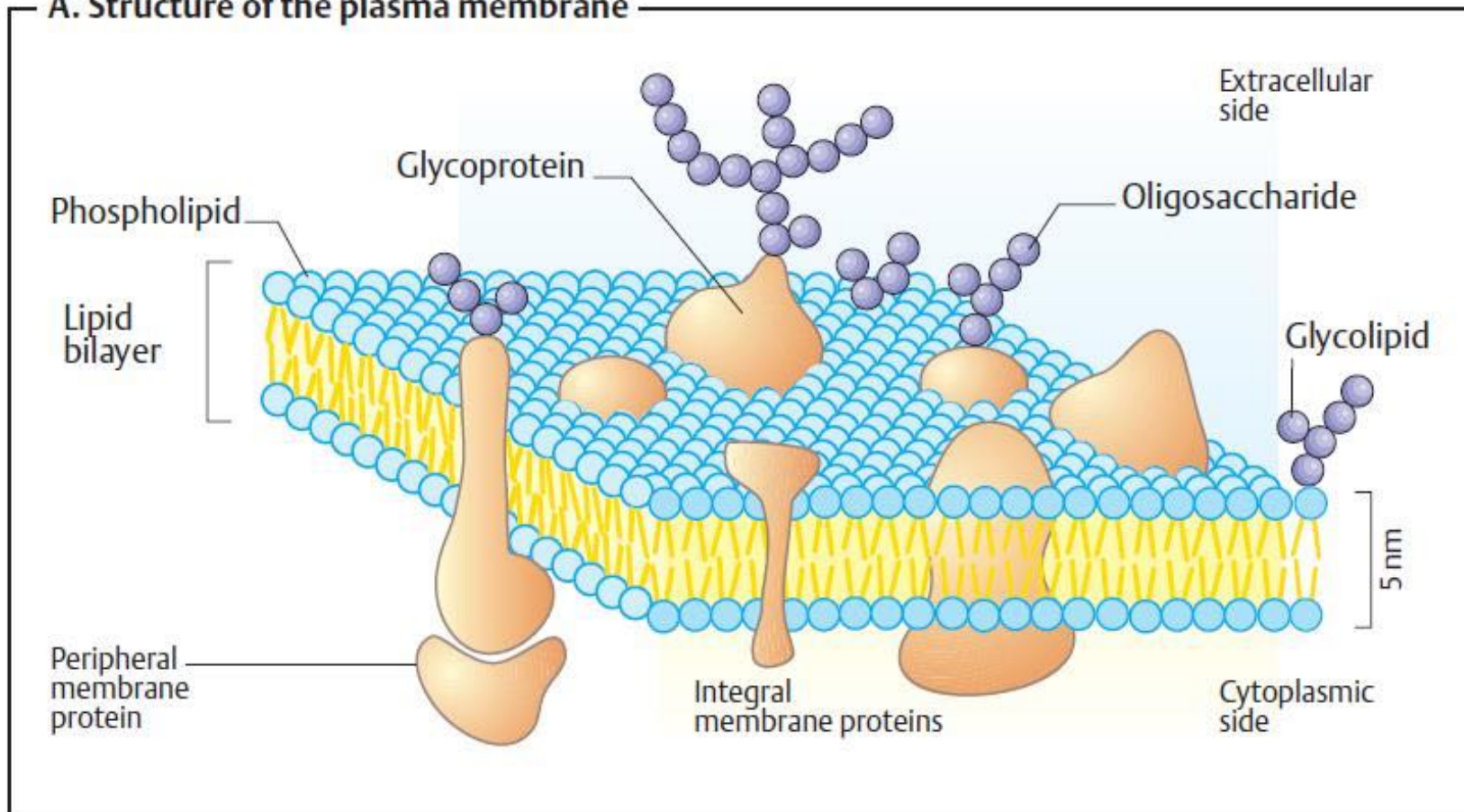


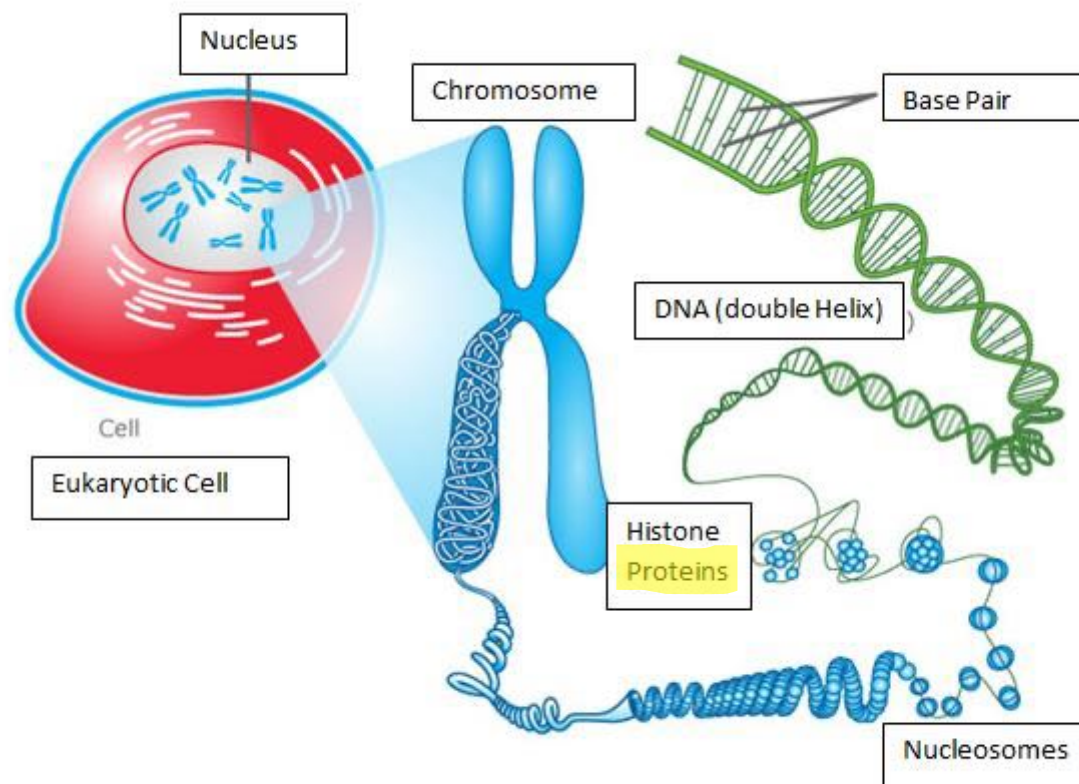
Cell





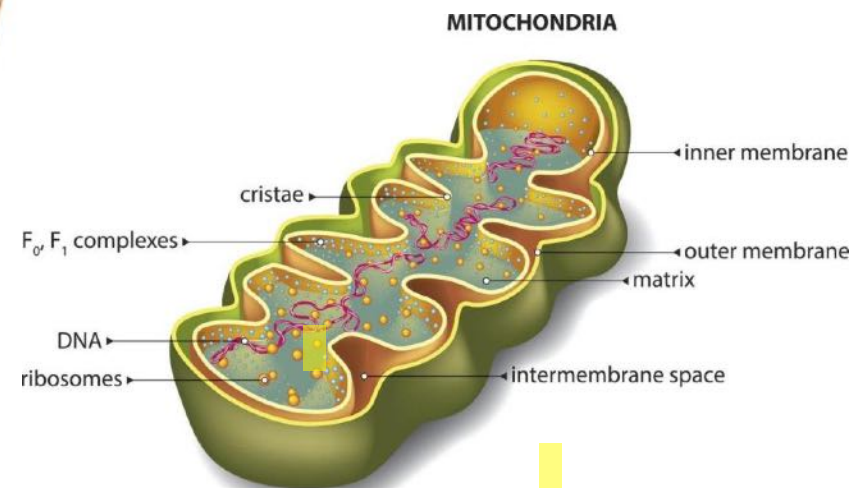
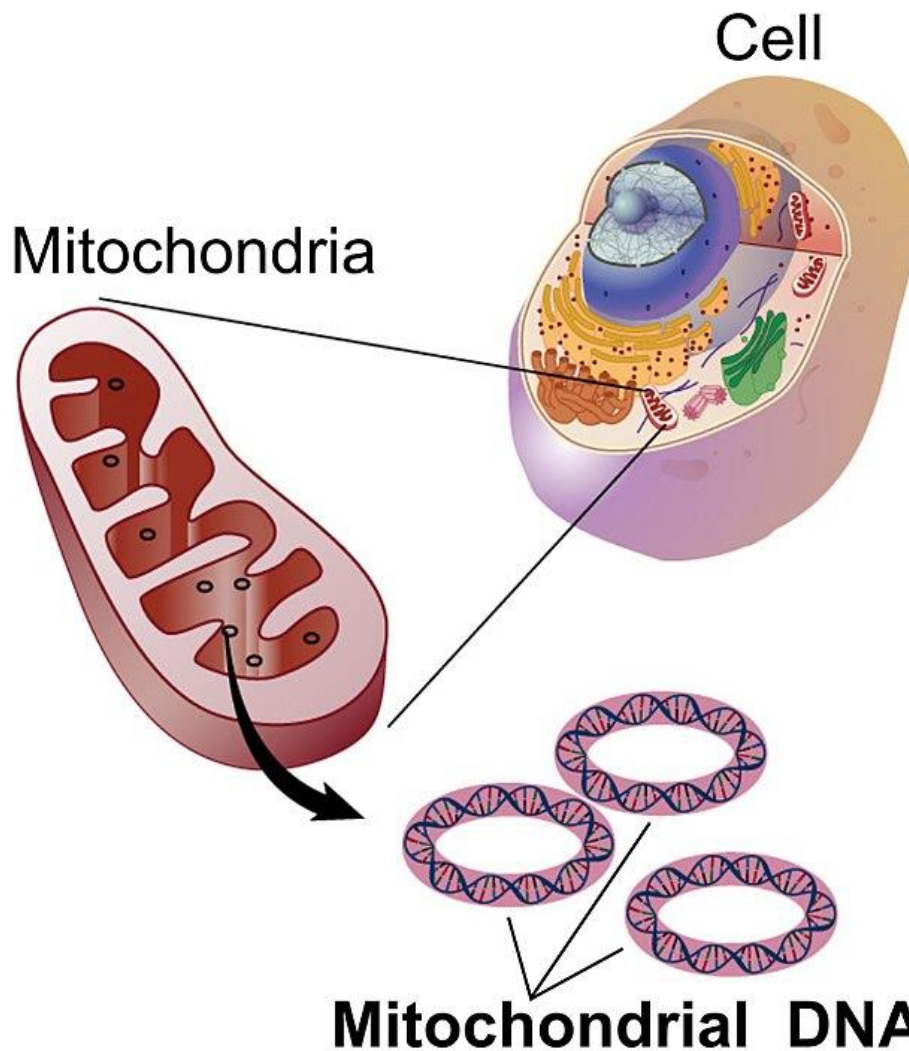
A. Structure of the plasma membrane







Mitochondrial DNA



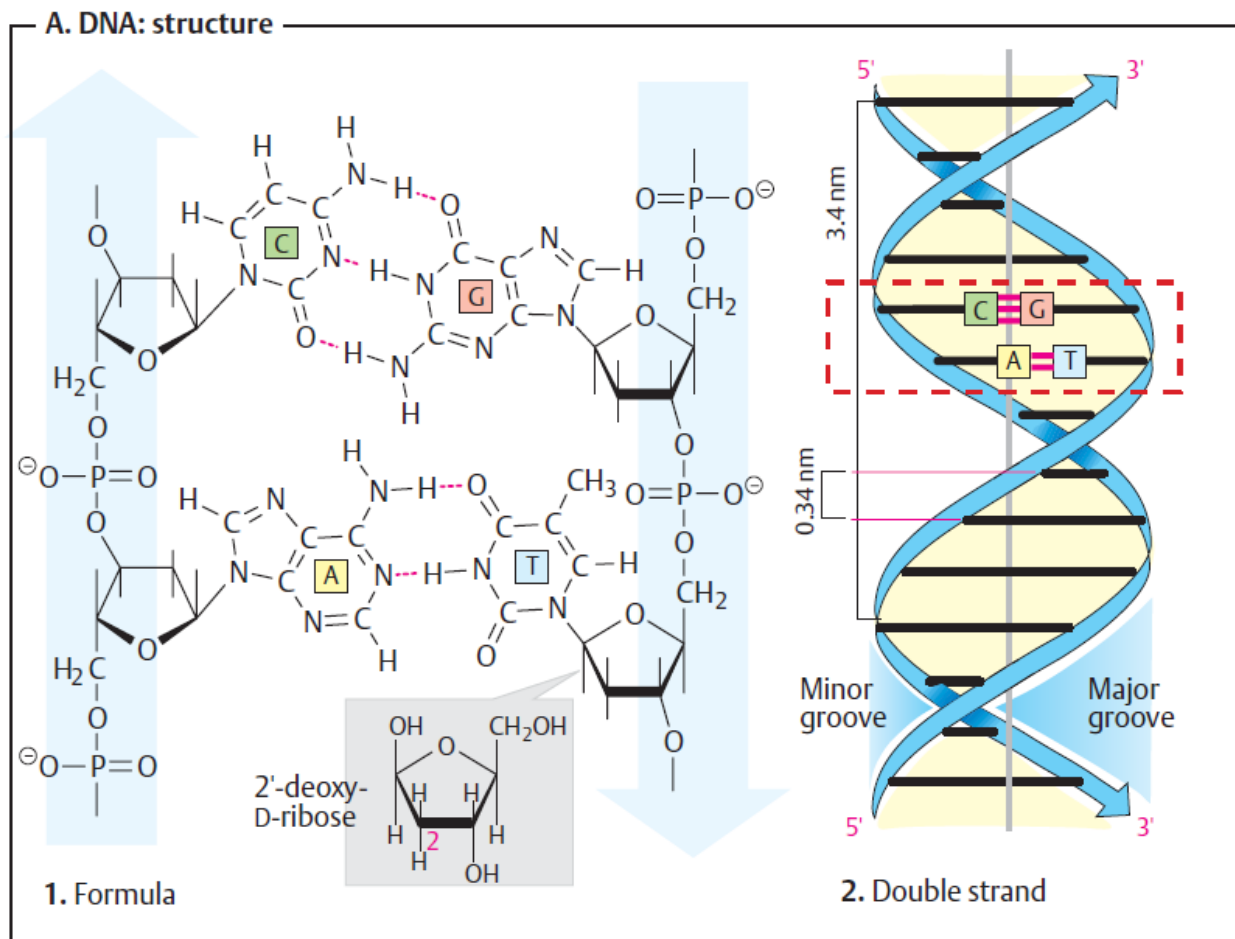


Struktur DNA inti

- Linear
- Dobel helix
- Antiparalel
- Bermuatan negatif
- gula deoksiribosa dan gugus fosfat sebagai kerangka utama untai (*backbone*)
- Untai satu dg lainnya dihubungkan dengan ikatan hydrogen antara basa nitrogennya.
 - C berpasangan dg G: dengan 3 ikatan hidrogen
 - A berpasangan dg T: dengan 2 ikatan hidrogen



Struktur DNA inti (Koolman dan Roehm, 2005)





DNA MITOKONDRIA

- ✦ Bentuk sirkuler, untai ganda
- ✦ Ukuran \pm 16,5 kb
- ✦ Kandungan G dan C 32-45,6% tersebar tidak merata di kedua untai
- ✦ Untai H (*heavy strand*) kaya G, untai L (*light strand*) kaya C



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

ISOLASI DNA



Isolasi DNA: Pendahuluan

- Secara umum, isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA yang ada dalam inti sel, mitokondria, (kloroplas, plasmid) dari komponen seluler lainnya.
- Isolasi DNA pertama dilakukan pada tahun 1869 oleh Friedrich Miescher.
- Isolasi DNA adalah proses pemurnian DNA dari sampel menggunakan kombinasi metode fisik dan kimia.
- Metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada jenis sampel, saat ini sudah banyak reagent atau kit yang didistribusikan secara komersial menyesuaikan jenis sampel



Isolasi DNA: Pendahuluan

- Isolasi DNA dipergunakan sebagai metode dasar dan dipergunakan untuk berbagai aplikasi, yang digunakan untuk tujuan penelitian ilmiah, medis, silsilah, taksonomi, forensik, dll.
- Isolasi DNA dapat dilakukan pada sel hewan, tumbuhan, micro organisme, protista, virus, dll.
- Adanya protein, lipid, polisakarida dan beberapa senyawa organik atau anorganik lainnya dalam preparasi DNA dapat mengganggu metode analisis DNA, dan dapat mengurangi kualitas DNA sehingga dapat menyebabkan penyimpanan DNA menjadi lebih pendek waktunya.

Prosedur Isolasi DNA



Isolasi DNA pada dasarnya terdiri dari beberapa langkah, yaitu:

1. Persiapan ekstrak sel.
2. Purifikasi DNA dari ekstrak sel
3. Pengukuran konsentrasi DNA Sampel.



Material DNA dapat berasal dari:

- Sumber untuk isolasi DNA sangat beragam.
- Pada dasarnya dapat diisolasi dari organisme hidup atau mati
- Hampir semua bagian tubuh seperti darah, jaringan, akar rambut, akar bulu, gigi, tulang, sel kulit, otot, dan kuku dapat digunakan sebagai material DNA, namun kuantitas DNA yang dikandung pada setiap bagian tubuh adalah tidak sama
- Dari sisi penyimpanan sampel: dapat berasal dari sampel jaringan yang diarsipkan atau telah disimpan, fresh atau juga organ/jaringan terparafin (formalin-fixed paraffin-embedded tissue)



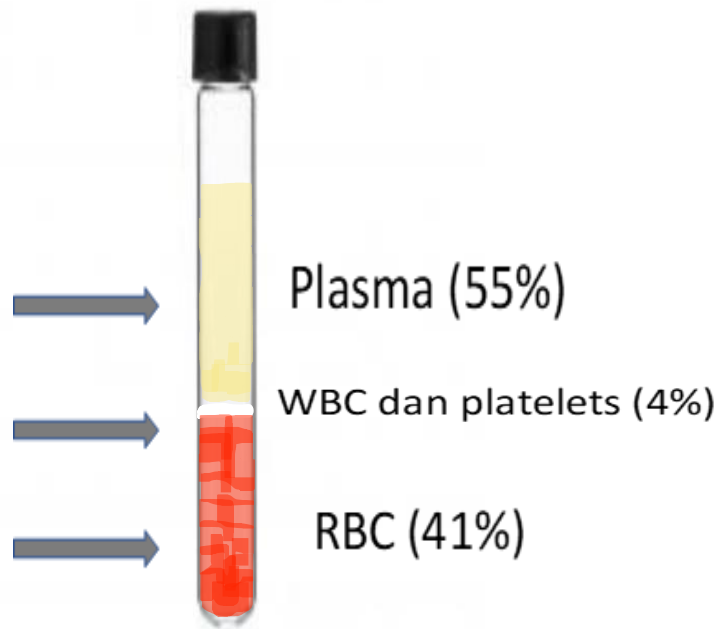
Koleksi sampel

- Sampel jaringan: alkohol; RNA latter
- Darah: EDTA, alcohol

 secepat mungkin dikerjakan



Komposisi darah



- Eritrosit tidak berinti:
Mamalia (kecuali unta)
- Eritrosit berinti:
 - Amphibia
 - Pisces
 - Aves
 - Reptilia



Prinsip dasar isolasi DNA

- Penghancuran dinding sel (*lysis of cell wall*)
- penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*),
- pengendapan DNA/ presipitasi DNA,
- dan pemanenan DNA
 - Merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya
 - Harus dilakukan dg baik dan bebas kontaminasi

 muncul berbagai Teknik ekstraksi dan purifikasi DNA dalam bentuk **kit**



ISOLASI DNA

- Phenol –Kloroform (konvensional)
- Kit Komersial



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

Phenol –Kloroform (konvensional)



Bahan untuk isolasi DNA

| STES buffer | Lysis buffer | Wash buffer/Larutan pencuci | Digestion buffer |
|---|--|--------------------------------|---|
| 1% (W/V) SDS 50mM Tris-HCl, pH 9,0 0,1M EDTA, pH 8,0 0,2M NaCl | 0,32M Sucrose 1% (V/V) TritonX-100 5mM MgCl 10mM Tris-HCl, pH 7,4 | 75mM NaCl 50mM EDTA, pH 8,0 | Larutan STES + 0,5 mg/ml Proteinase K |
| TE buffer 10mM Tris_HCl 1mM EDTA pH 8,0 | Alkohol absolut dingin | Alkohol 70% | Buffer 1X TBE 89mM Tris 89mM asam borat 2mM EDTA, pH 8,0 |
| CIAA Chloroform: 24 bag Isoamyl alcohol: 1 bag | Phenol | RNAse Jika perlu | |

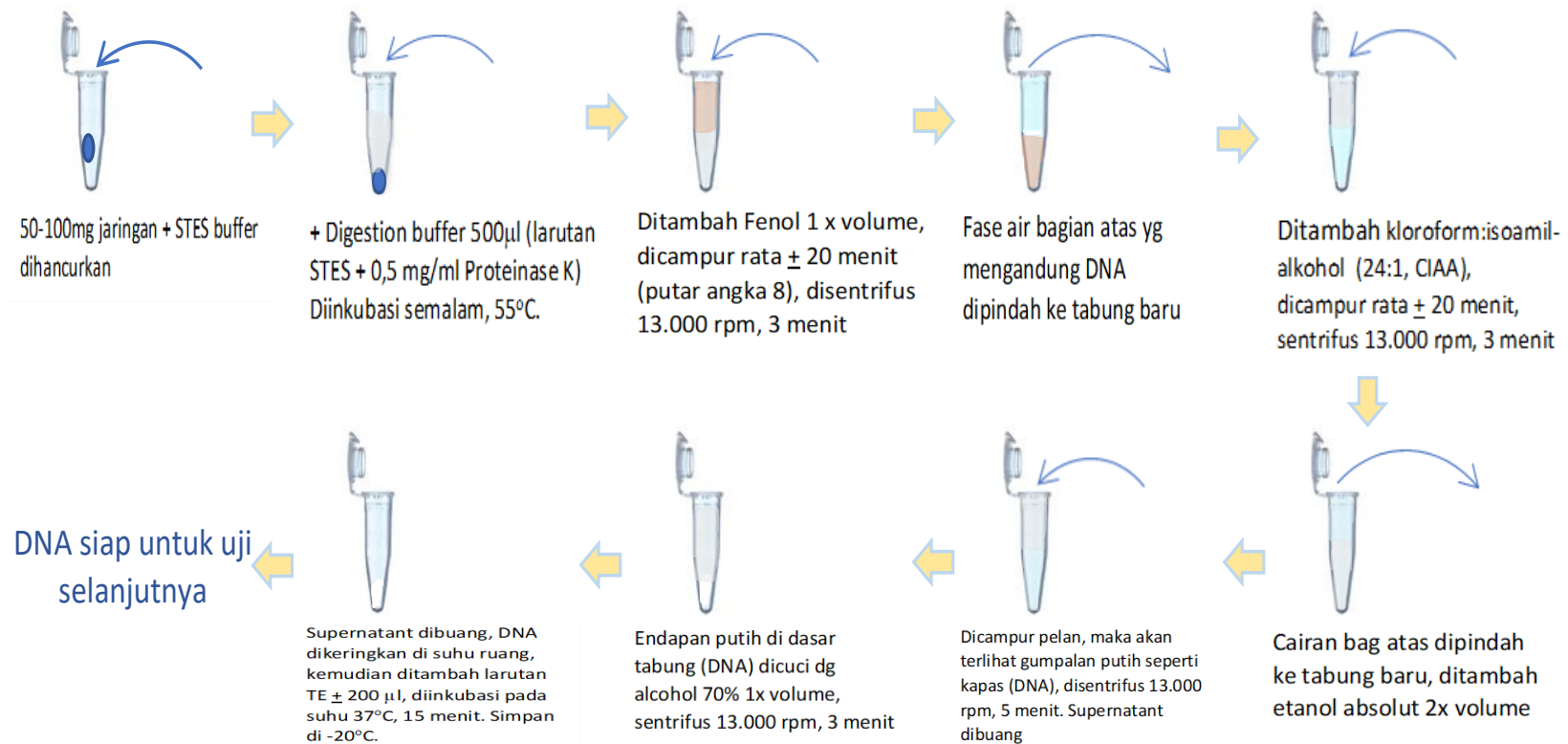


Fungsi bahan yang diperlukan untuk isolasi DNA

- **EDTA**: mengikat ion Mg (ion yg berperan untuk mempertahankan integritas sel dan mempertahankan aktivitas enzim nuclease)
- **SDS**: sejenis deterjen yang berfungsi merusak membrane sel
- **Proteinase K**: merusak protein
- **Phenol**: membersihkan protein dari nukleotida (DNA dan RNA)
- **CIAA**: membersihkan sisa protein dan polisakarida dari larutan
- **RNAse**: menghancurkan RNA
- **Alkohol absolut**: mempresipitasikan DNA

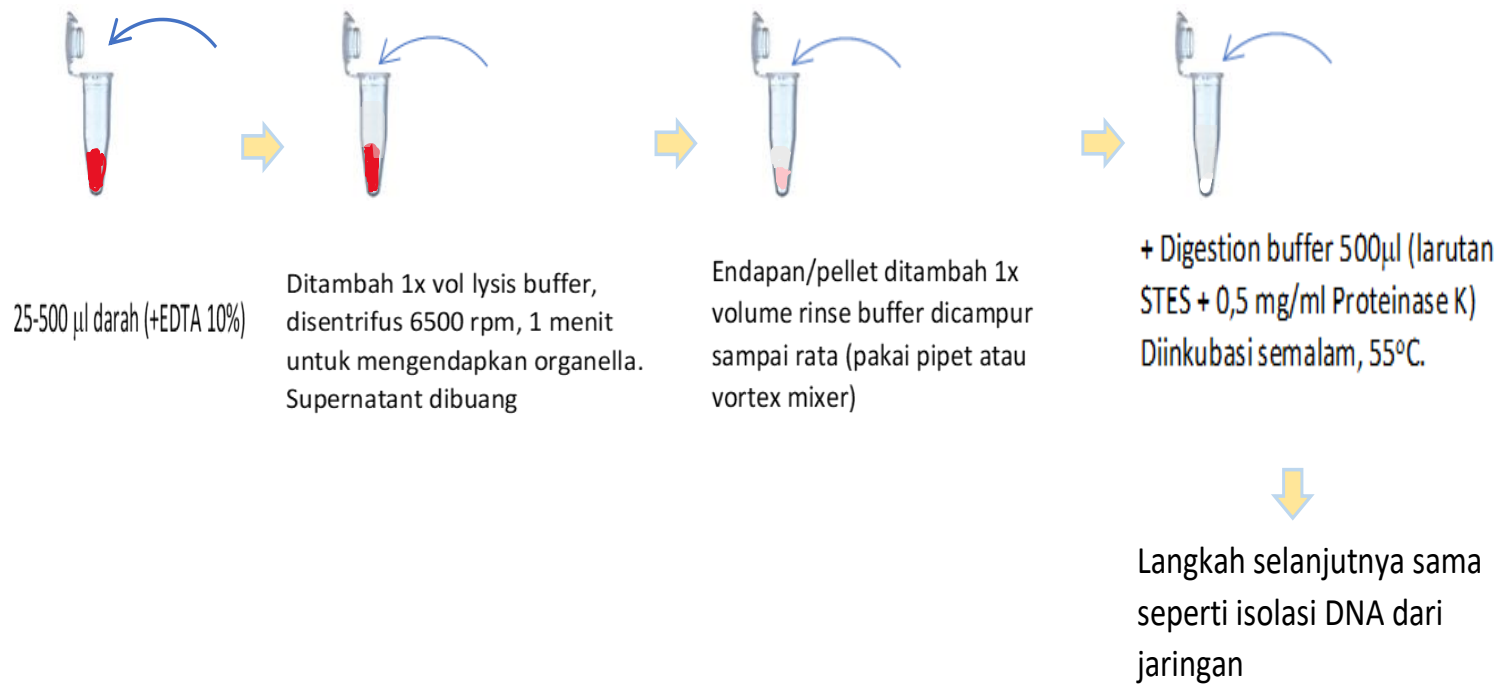


Isolasi DNA dari jaringan



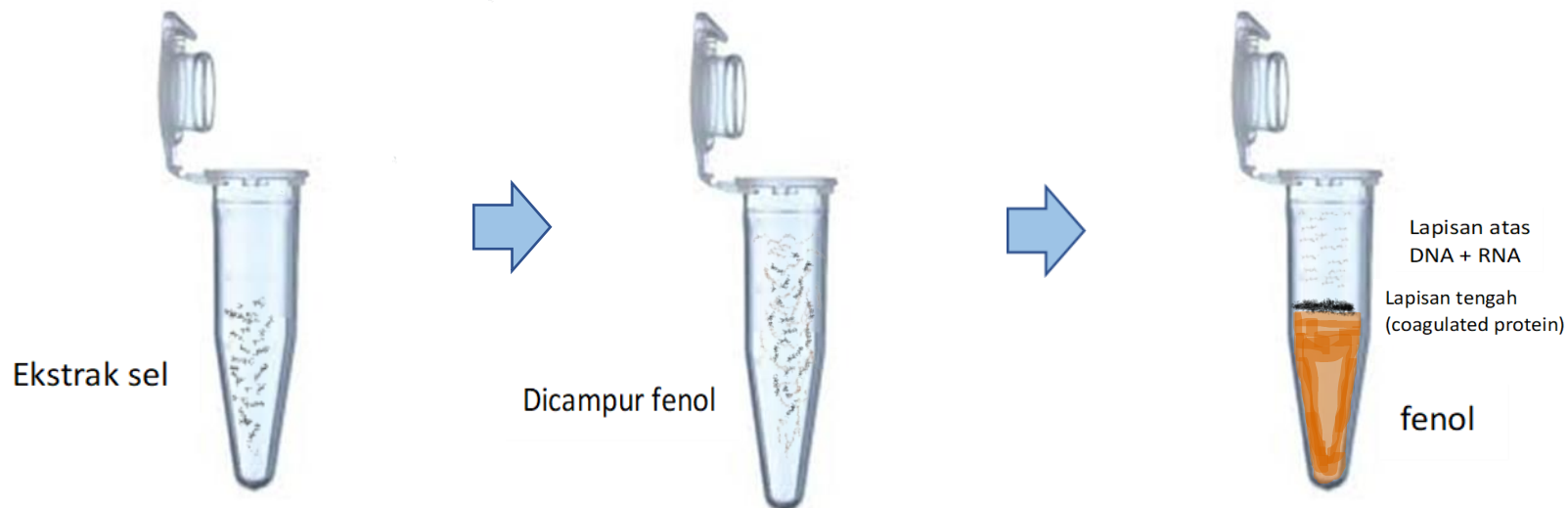


Isolasi DNA dari darah





Penambahan Phenol





Kelebihan dan kekurangan:

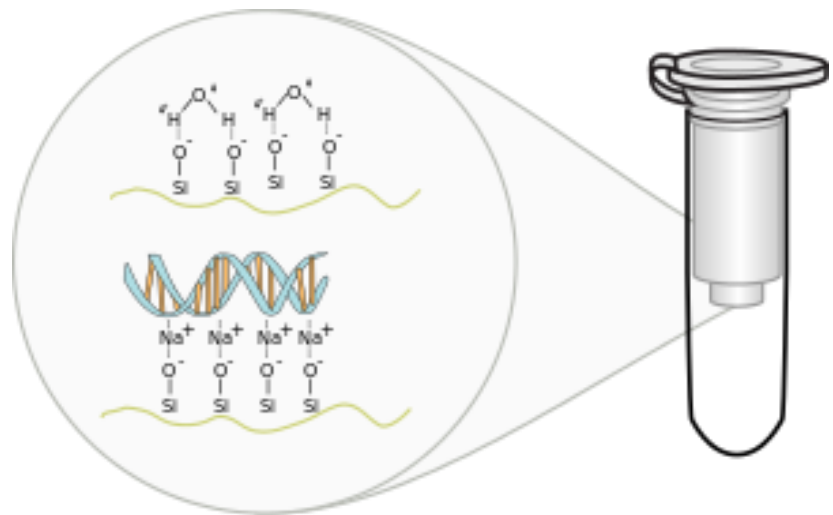
- **Kelebihan:**
 - jumlah materi yg akan diisolasi dapat disesuaikan dengan kebutuhan
 - Lebih murah
- **Kekurangan:**
 - Waktu lebih lama
 - Kemurniannya lebih rendah
 - Tidak praktis



KIT KOMERSIAL

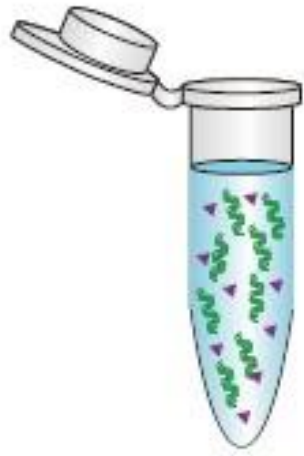
Mini column purification

- Metode purifikasi DNA yang saat ini paling banyak diterapkan pada berbagai macam kit isolasi DNA komersial
- Prinsip: DNA akan berikatan dengan membrane silica yang berada pada spin coloumn,





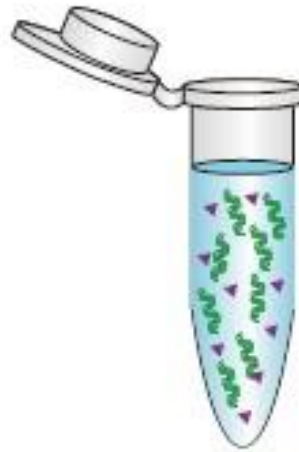
Isolasi DNA dengan Kit



1. Preparasi sampel, lysis cell, dan denaturasi protein

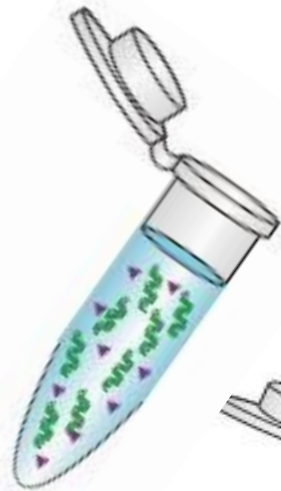
: proteinase K & chaotropic salt__

Inkubasi bbrp menit/jam/ over night



2. Penambahan alkohol absolut (dingin):

Presipitasi DNA



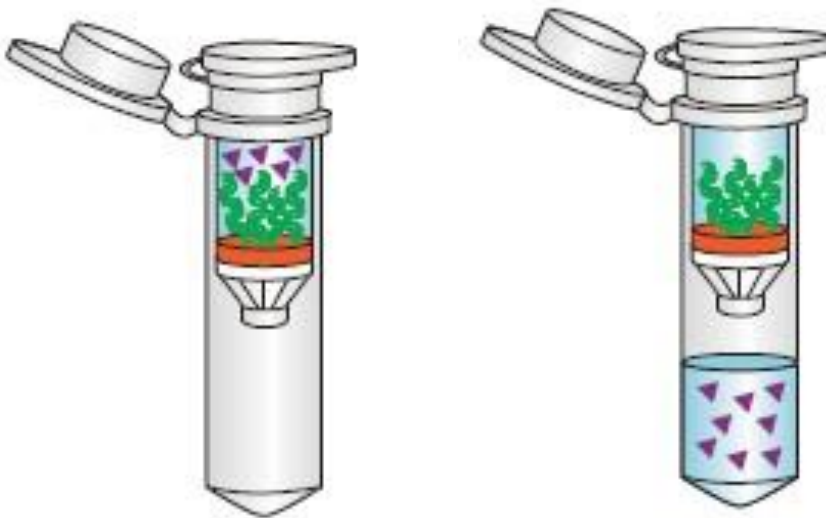
3. Larutan dipindah ke dalam spin coloumn:
tip pippete jangan sampai menyentuh
filter



4. DNA terikat ke membran dan kontaminan
tetap sebagai suspensi

Membran: silica membrane pada matriks
spin column

Dilakukan sentrifugasi



5. Pencucian (2x):

wash (menghilangkan kontaminan sementara DNA tetap terikat pada membran)
menggunakan wash buffers, dilakukan sentrifugasi



5. **Sentrifugasi kosong:** untuk mengeringkan spin coloumn dari sisa wash buffer
6. Tunggu di suhu ruang sampai bau alcohol di dalam filter hilang
7. **Pindah spin coloumn:** pada microtube baru
8. **Elusi :** menggunakan elution buffer
Hasil elusi adalah DNA yang murni



Pengukuran Konsentrasi DNA

- Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm
- Nilai rasio absorban pada λ 260 nm dan 280 nm memberikan informasi tentang kemurnian sampel DNA. DNA murni memiliki nilai rasio A_{260}/A_{280} sekitar 1.8 - 2.0. Nilai ini menunjukkan bahwa sampel DNA relatif bebas dari kontaminasi protein.
- Namun, jika nilai rasio A_{260}/A_{280} kurang dari 1.8, ini menunjukkan adanya kontaminasi protein maupun fenol dalam sampel DNA.
- Nilai rasio yang lebih tinggi dari 2.0 menandakan adanya kontaminan lain, seperti RNA.



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

Elektroforesis DNA





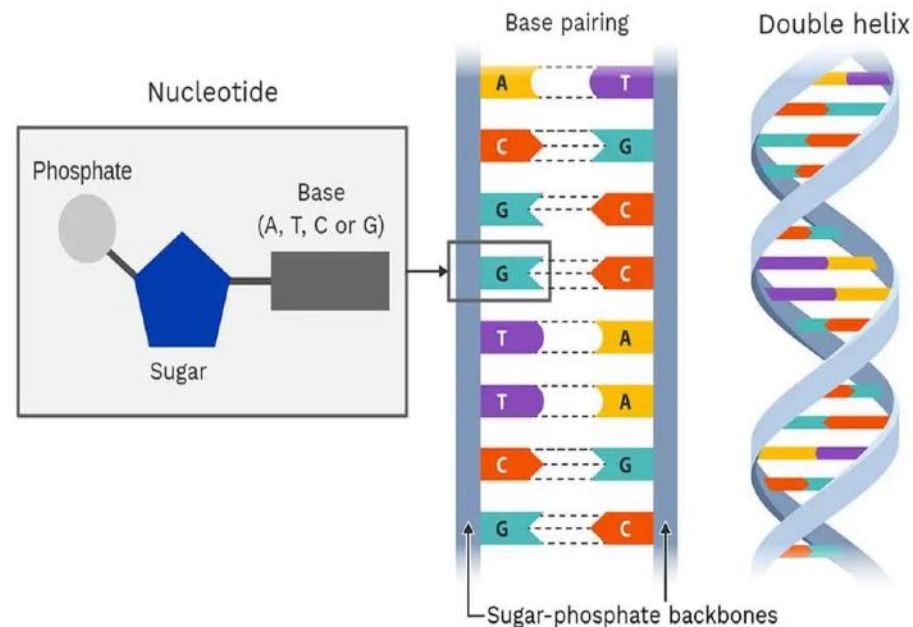
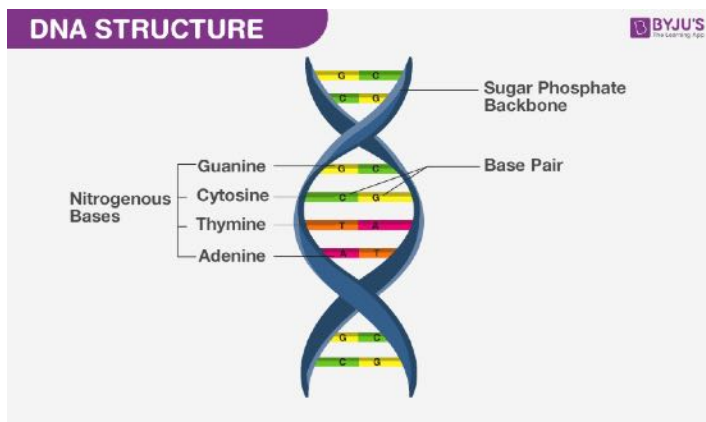
Definisi

Elektroforesis DNA adalah suatu proses pemisahan molekul DNA pada suatu gel atau matriks yang berupa agarose gel dengan berdasarkan pada muatan molekul dan ukuran molekul

- DNA adalah asam organik, dan bermuatan negatif (gugus PO_4^-)
- Ketika DNA terkena medan listrik, partikel bermigrasi ke arah elektroda positif
- Fragment atau ukuran DNA yang lebih kecil dapat melakukan migrasi lebih jauh dalam waktu tertentu daripada potongan atau fragment yang lebih besar

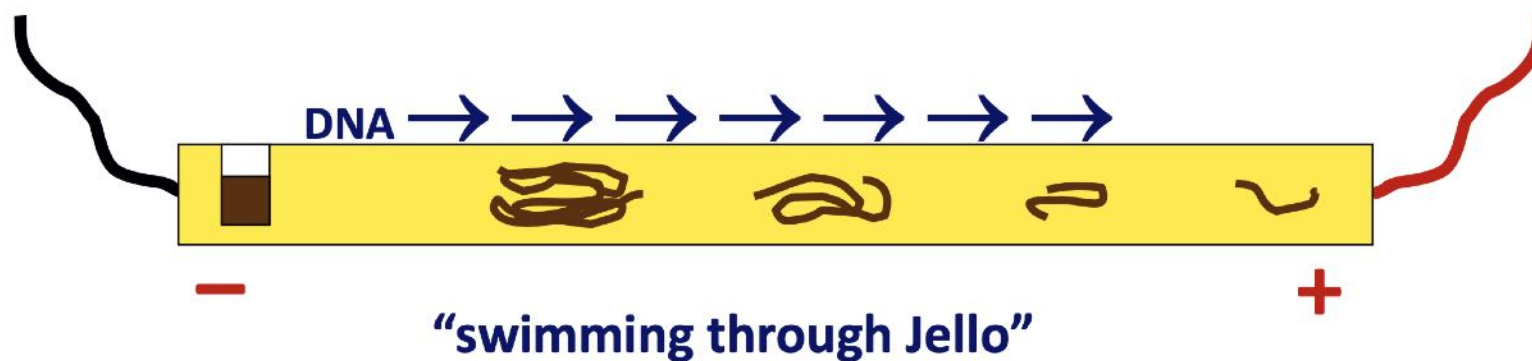


Mengapa DNA bermuatan Negatif





Bagaimana Partikel DNA Bermigrasi?





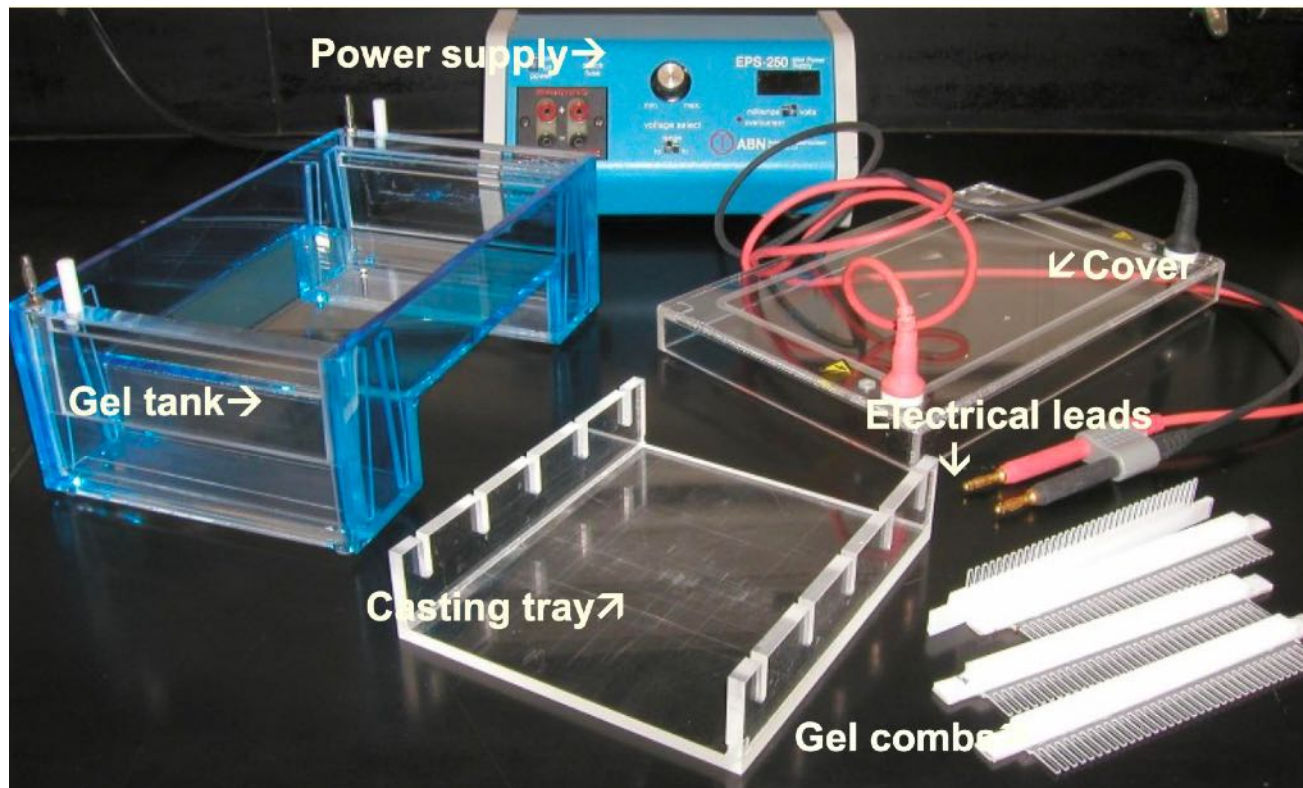
Persiapan Elektroforesis DNA

Yang perlu dipersiapkan untuk melakukan elektroforesis DNA:

1. Sampel DNA yang telah diisolasi
2. Elektroforesis DNA Chamber beserta sisiran (comb)
3. Power supply
4. Buffer elektroforesis
5. Agarose gel
6. Pewarna DNA atau Dye

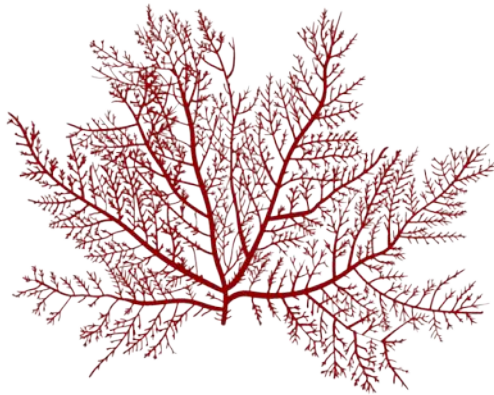


Peralatan Elektrofesis DNA





Agarosa Gel



Gelidium



- Merupakan rantai gula kompleks dari rumput laut merah (Species: *Gellidium* atau *Gracillaria*)
- Bertindak sebagai matriks tempat molekul bergerak sekaligus saringan atau tunnel untuk memisahkan molekul.
- Sumber:
 1. *Gellidium*: Morocco, Spain, Portugal, Japan and South Korea
 2. *Gracillaria*: China, Indonesia and Chile.



Agarosa Gel

- Konsentrasi gel mempengaruhi migrasi molekul
- Matriks padat ini akan memungkinkan pemisahan fragmen berdasarkan ukuran.
- konsentrasi rendah = pori-pori lebih besar sehingga lebih sesuai untuk resolusi fragmen DNA yang lebih besar
- konsentrasi tinggi = pori-pori lebih kecil lebih sesuai untuk resolusi fragmen DNA yang lebih kecil





Resolusi Fragment

- Konsentrasi Gel – Tergantung pada ukuran fragmen DNA yang akan dipisahkan

| % Agarose | Ukuran DNA Fragmet (bp:basepairs) |
|-----------|--------------------------------------|
| 0,2-0,4 | Lebih dari 30.000 bp |
| 0,5 | 30.000-1000 |
| 0,7 | 12.000-800 |
| 1 | 10.000-500 |
| 1,2 | 700-400 |
| 1,5 | 300-200 |





Buffer

Terdapat dua jenis buffer yang umum digunakan pada elektroforesis DNA yaitu:

1. TAE (Tris -acetate-EDTA) dan
2. TBE (Tris-borate- EDTA)

Fungsi

- Tris Acetic acid atau Tris borate menyediakan ion untuk mendukung konduktivitas dan menjaga pH
- EDTA berfungsi untuk mencegah molekul dapat bertahan di dalam matriks
- Penggunaan buffer sangat mempengaruhi DNA migration
 1. Penggunaan air sbg buffer akan menyebabkan tidak ada migrasi
 2. Konsentrasi buffer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan gel agarose tidak dapat mengental



Perbandingan TAE dan TBE

| Properties | TBE | TAE | Keterangan |
|--|------------------------------------|---|--|
| Kemampuan buffering | Tinggi | Rendah | TBE dapat dipakai berulang, sedangkan TAE hanya dapat digunakan 1 kali |
| Support Migrasi | Rendah | Tinggi | Konduktivitas TAE lebih baik daripada TBE |
| Resolusi | High resolution long DNA fragments | High resolution for Short DNA fragments | TBE supports agarose cross-linking better than TAE |
| Kemampuan modifikasi enzimatis pada gel purifikasi | Rendah | Tinggi | Borat merupakan inhibitor enzim pada berbagai macam proses biologi |
| Recovery DNA dari gel agarosa | Rendah | Baik | Borat merupakan inhibitor enzim pada berbagai macam proses biologi |



Perbandingan TAE dan TBE

| Properties | TBE | TAE | Keterangan |
|------------------------------|-------------|----------------|------------|
| Integritas DNA | Tinggi | Rendah | - |
| Harga | Lebih mahal | Lebih murah | - |
| Buffer aktif | Tris-Borat | Tris – Acetate | - |
| Konsentrasi Ketika digunakan | 1x | 0,5x | - |



DNA ladder

- DNA ladder digunakan sebagai penanda identifikasi dari sampel yang digunakan atau *di-running*
- DNA ladder merupakan ukuran standar dari fragment yang *di-running*
- DNA ladder dibuat dari proses pemotongan fragmen DNA yang telah diketahui ukurannya dengan menggunakan enzim restriksi
- Saat ini tersedia berbagai macam ukuran DNA ladder yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan analisis

Contoh. Ladder 50 bp, 100 bp, 500 bp, 1000 bp, 3000 bp dst

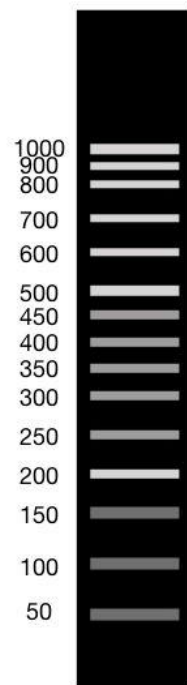


Syarat DNA ladder:

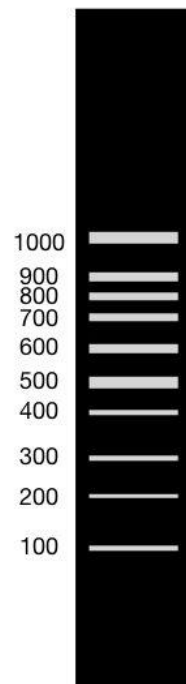
1. Setiap fragmen ladder harus dapat dipisahkan satu sama lain.
2. Setiap fragmen ladder memiliki konsentrasi yang cukup untuk divisualisasikan pada gel
3. Komposisi DNA staining tidak boleh mempengaruhi spesifisitas ladder DNA.
4. Ladder harus cukup stabil untuk digunakan dalam jangka waktu yang lebih lama.
5. Ladder harus sangat murni, Jangan gunakan, jika berisi beberapa fragmen yang tidak perlu atau tidak dikenal (dalam hal ini cek data sheet).



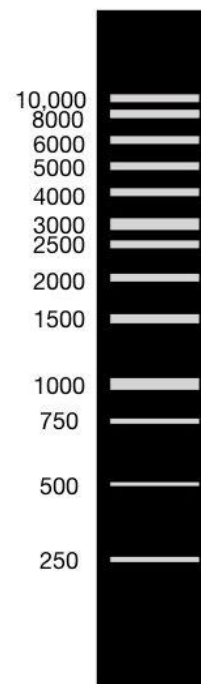
DNA ladder



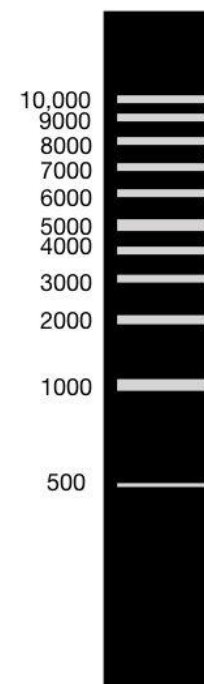
50bp



100bp



500bp



1000bp



DNA ladder

DNA Ladders

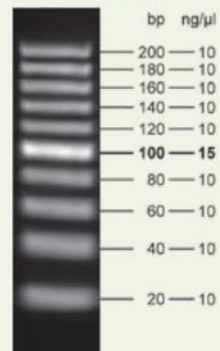
Unstained and fluorescent DNA Ladders



Jena Bioscience

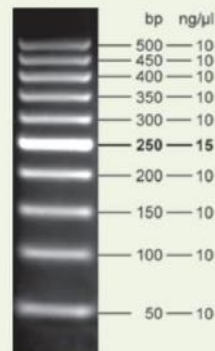
Building Blocks of Life

20 bp DNA Ladder



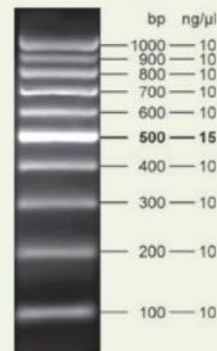
3.6% Agarose

50 bp DNA Ladder



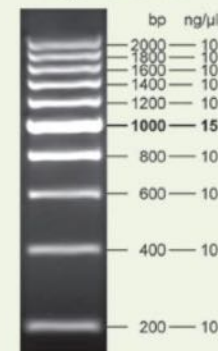
3.0% Agarose

100 bp DNA Ladder



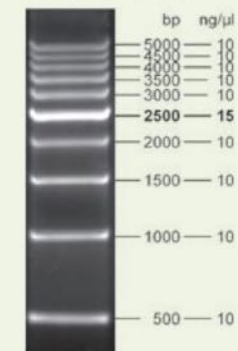
2.4% Agarose

200 bp DNA Ladder



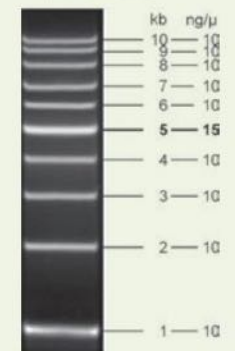
1.8% Agarose

500 bp DNA Ladder



1.2% Agarose

1 kb DNA Ladder



0.6% Agarose



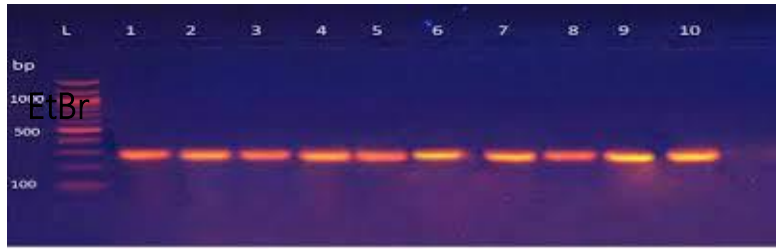
DNA staining

Ada beberapa pewarnaan berbeda yang dapat digunakan untuk memvisualisasikan dan memotret DNA setelah DNA dipisahkan dengan elektroforesis gel:

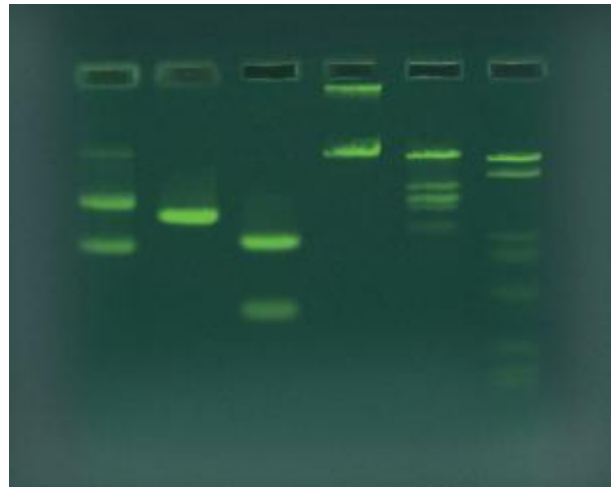
1. Ethidium Bromide
2. Syber safe
3. Syber green
4. Syber Gold

Saat ini dipasarkan dengan berbagai macam merk

DNA staining



Sybr safe





UNIVERSITAS
GADJAH MADA

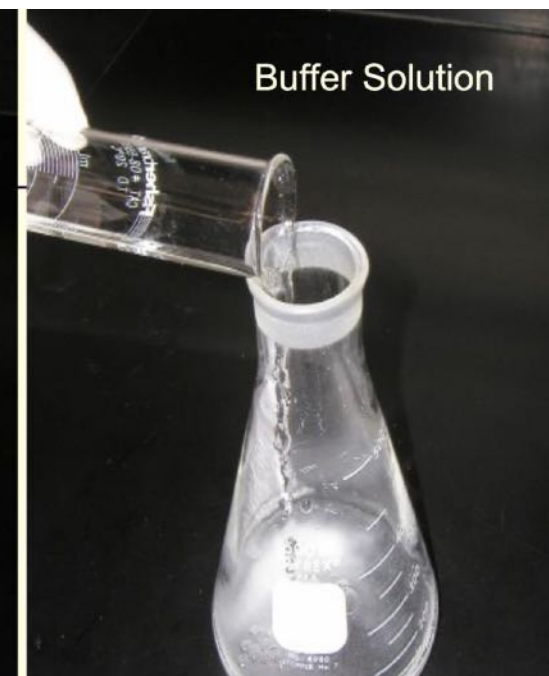
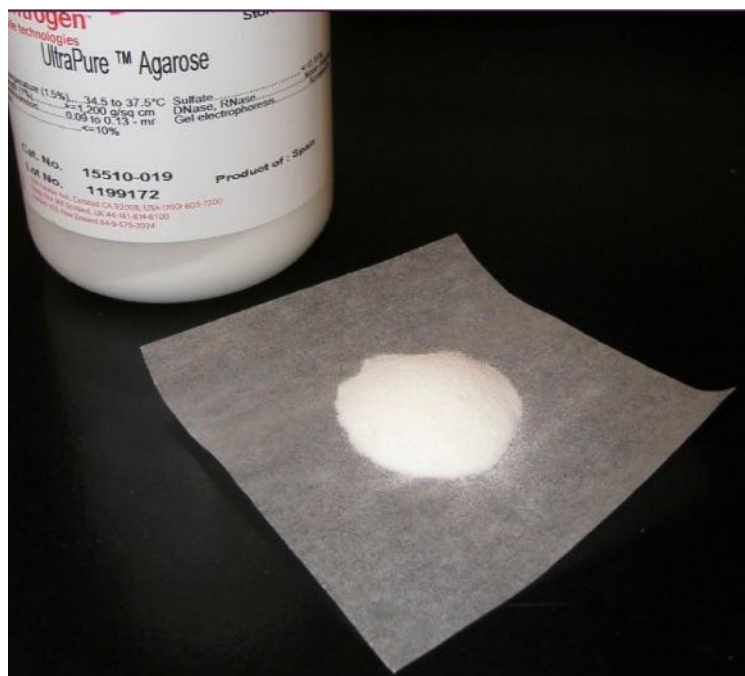
Langkah-Langkah Elektroforesis DNA





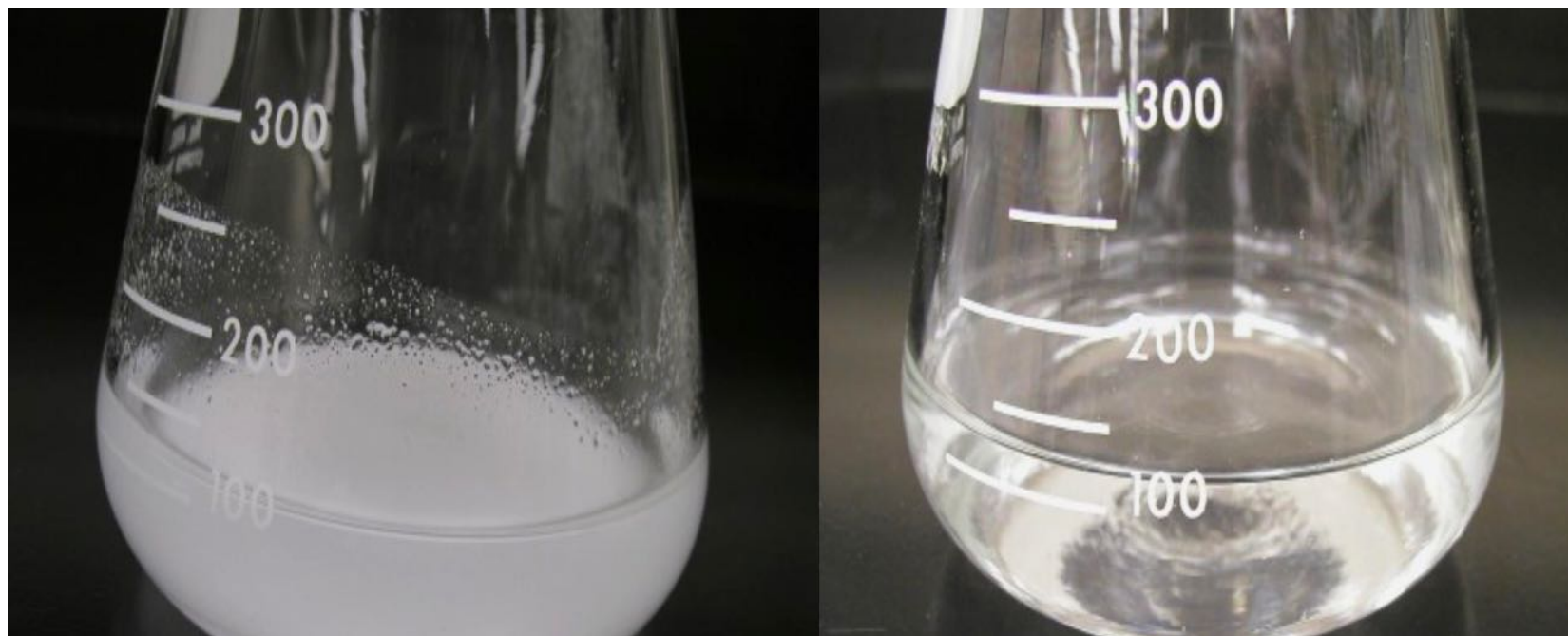
Langkah-Langkah Elektroforesis DNA

1. Menyiapkan Gel
2. Memasukkan ladder atau lane dan sampel
3. *Running* gel



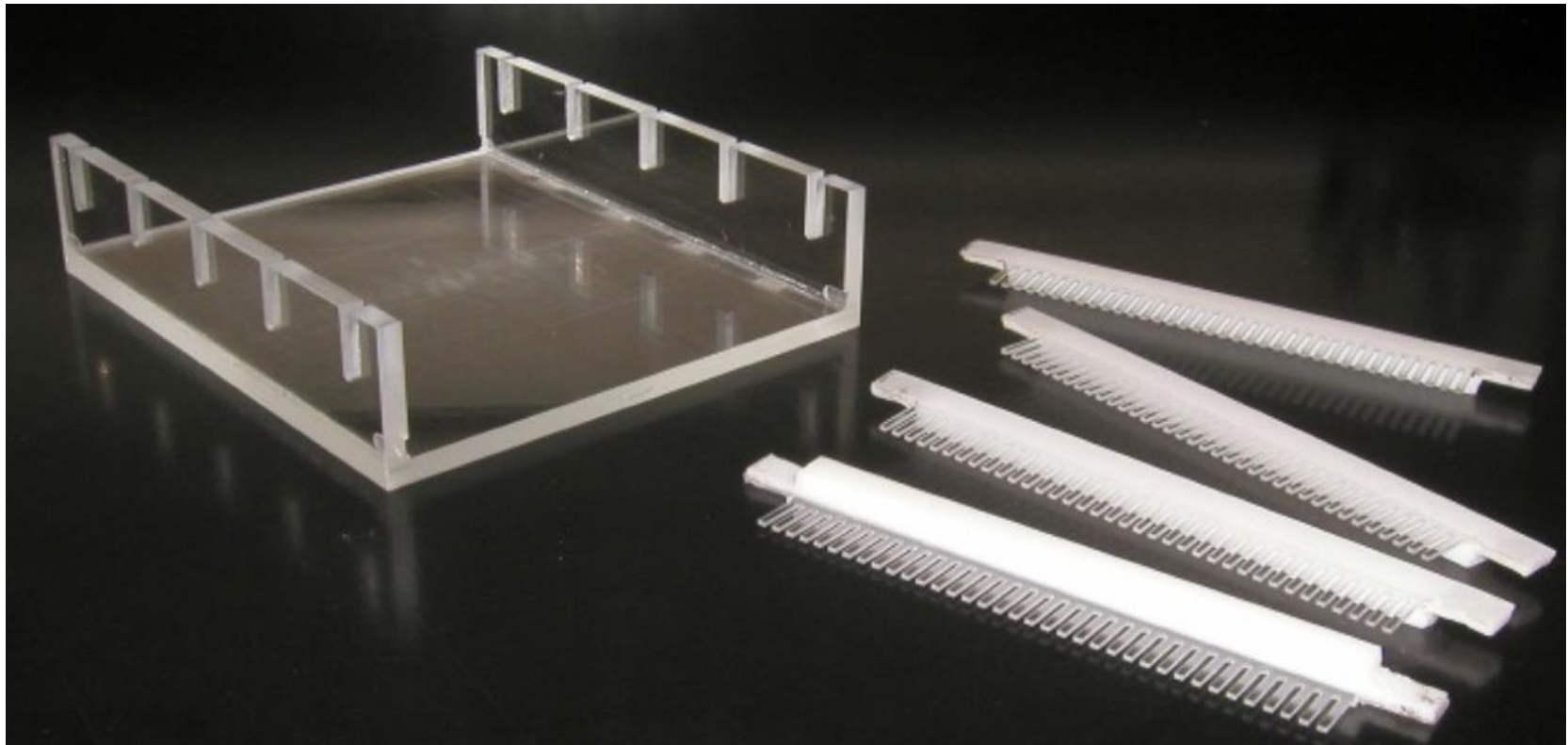


Pemanasan



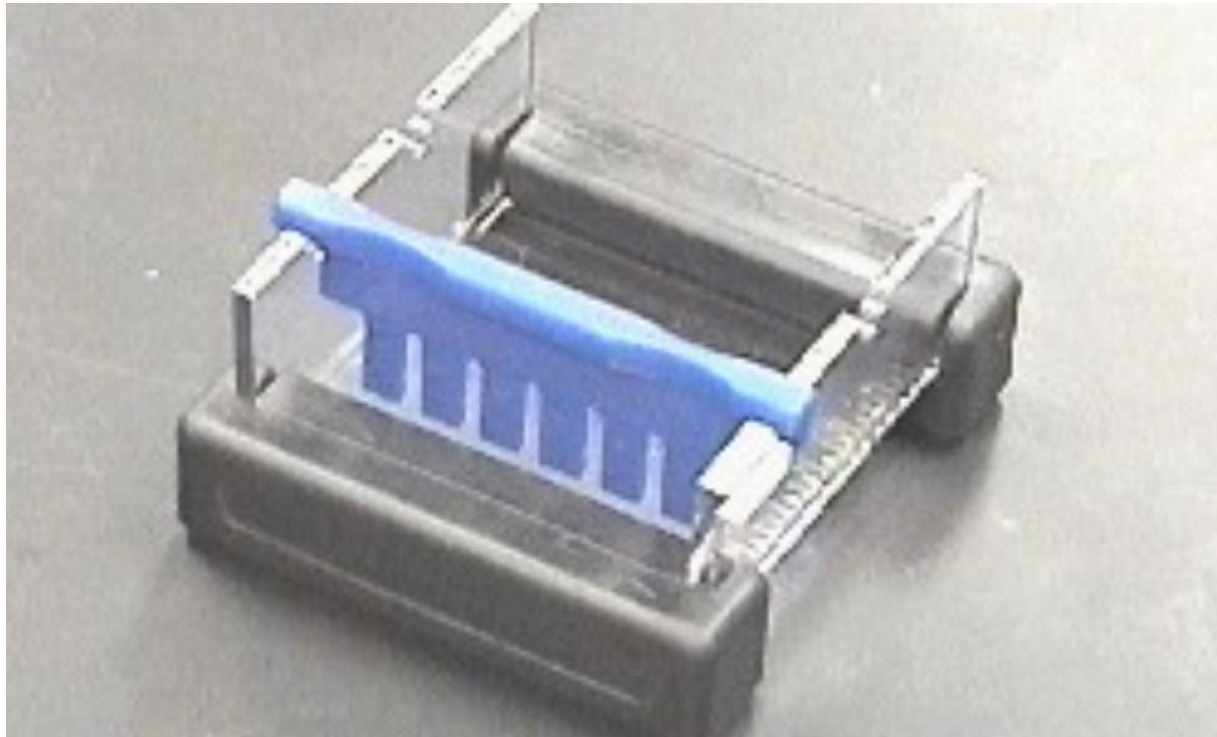


Tray elektroforesis dan comb





Posisi *comb* pada cetakan





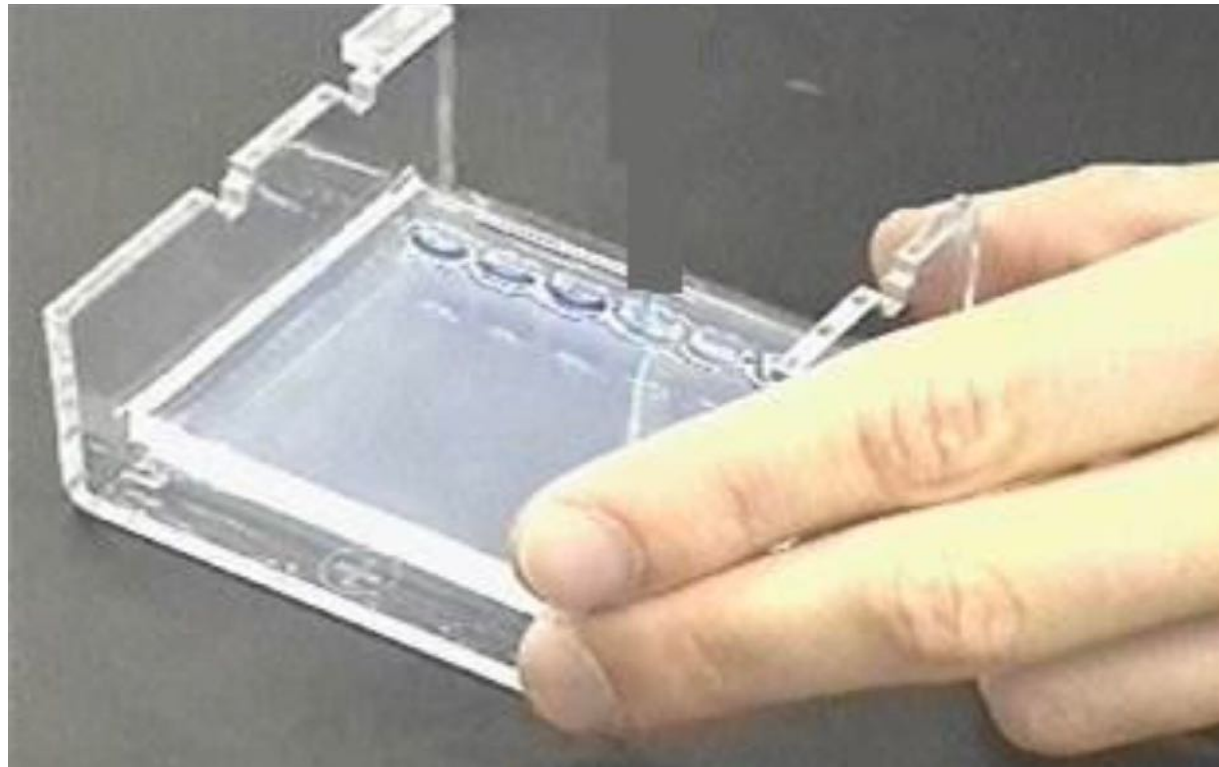
Penuangan larutan agarose

- Larutan agarose sudah ditambah dengan DNA staining, dituang dalam kondisi hangat-hangat kuku



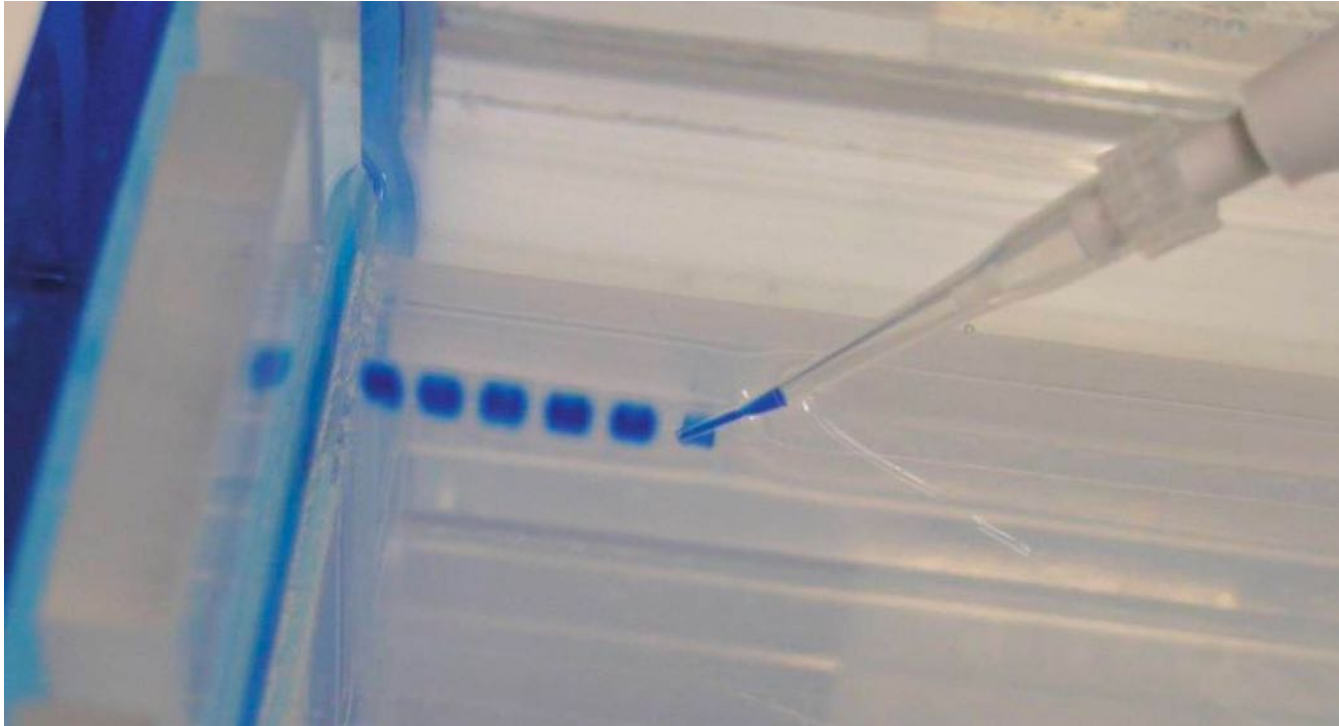


Gel yang telah memadat



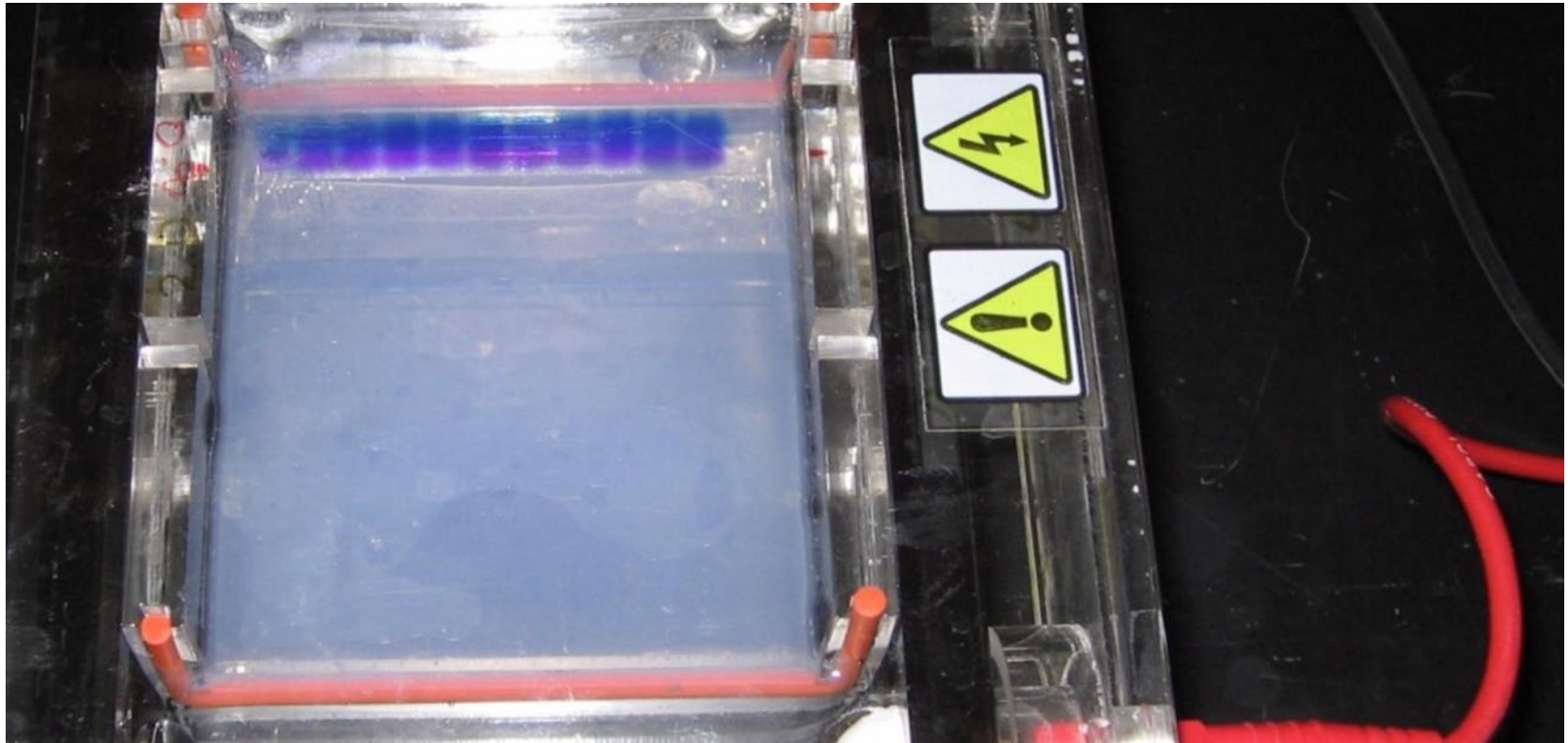


Loading Sampel dan Ladder



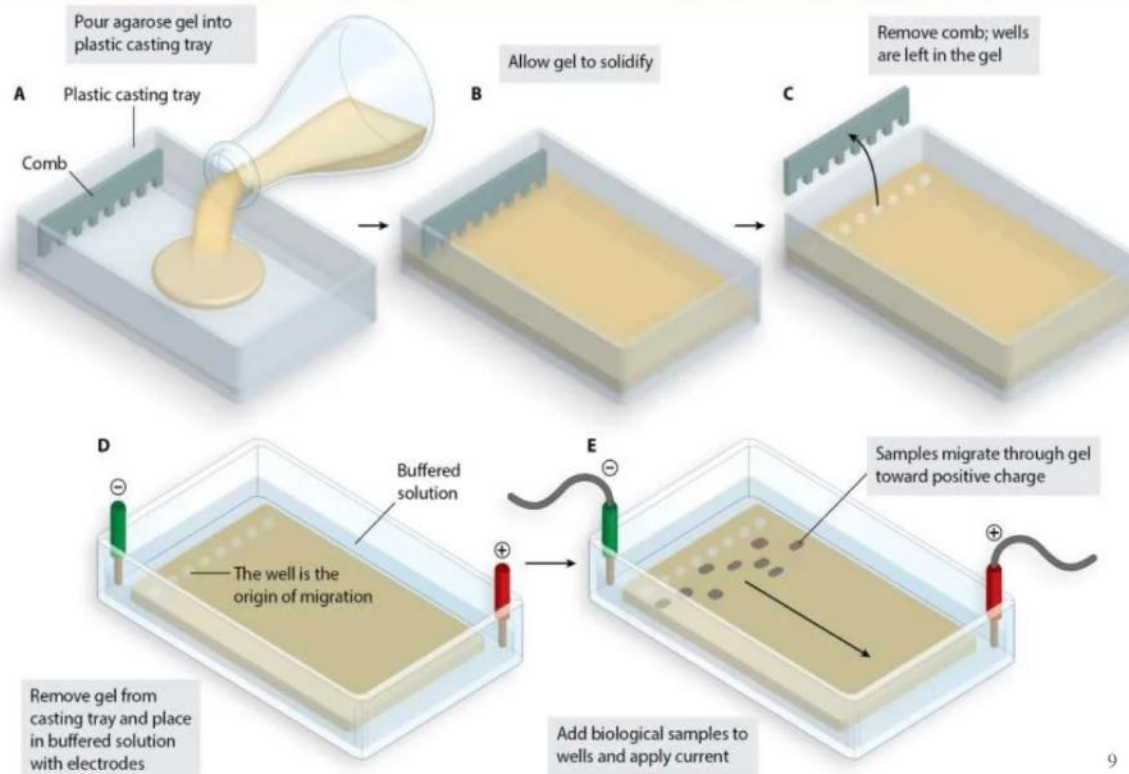


Running Gel





Elektroforesis DNA ringkasan





Manfaat

Analisis ukuran molekul

Pemisahan dan ekstraksi molekul

Kuantifikasi molekul

