

Optimalisasi Ekstraksi DNA Dan PCR Untuk Identifikasi Molekuler Pada 4 Jenis Karang Lunak Berbeda

Aradea Bujana Kusuma

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Papua, Manokwari Papua Barat, Indonesia

*Corresponding author: aradea.bujana@gmail.com

Received: 31 Maret 2022; Revised: 1 Juli 2022; Accepted: 10 September 2022

ABSTRAK

Karang lunak merupakan salah satu penyusun komunitas karang yang berguna bagi ekosistem terumbu karang. Keberadaanya di ekosistem terumbu karang sangat penting bagi proses rantai makanan di lautan. Sulitnya identifikasi morfologi karang ini disebabkan variasi sklerit yang beragam. Oleh karena itu penting adanya identifikasi molekuler sebagai penunjang data taksonomi karang ini. Akan tetapi, dalam proses identifikasi molekuler karang ini masih banyak hambatan yang terjadi dalam proses ekstraksi maupun PCR nya. Hal ini dimungkinkan karena adanya kalsium karbonat yang tersusun di seluruh tubuh karang ini. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan proses ekstraksi DNA dan PCR yang optimal dalam proses identifikasi secara molekuler. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan Kit Ekstraksi dan PCR dengan menggunakan KIT PCR. Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa *Xenia* sp memiliki konsentrasi DNA yang tertinggi dengan nilai 53.90 (ng/ul) dan terendah pada jenis *Sarcophyton trocheliophorum* sebesar 26.70 (ng/ul). Optimalisasi PCR menghasilkan hasil yang baik pada spesies *Xenia* sp., dan *Lobophytum pauciflorum* sedangkan pada sampel jenis *Sarcophyton trocheliophorum* pita DNA menunjukkan hasil yang smear.

Keywords: Ekstraksi, Identifikasi, Karang Lunak, Molekuler, PCR

ABSTRACT

Soft coral is the part of coral reef ecosystem that have important function for coral reef ecosystem. The presence of soft coral in the coral reef ecosystem is crucial for the process of food chain in the ocean. The difficulty of identified softcoral morphology due to diverse variations of sclerite. Therefore, it is important to used molecular identification as supporting of taxonomic data of coral. However, in the process of molecular identification there is still a lot of constraints that occurs in the extraction process and PCR. It caused by the presence of calcium carbonate arranged throughout

the coral body. The aim of this research was to known optimal processes of DNA extraction and PCR. DNA Kit extraction and PCR KIT were used in this research. The extraction results showed that Xenia sp had the highest concentration of DNA with a value of 53.90 (ng/ul) and the lowest was for Sarcophyton trocheliophorum of 26.70 (ng/ul). PCR optimization produced good results on Xenia sp., and Lobophytum pauciflorum species while on samples of Sarcophyton trocheliophorum DNA bands showed smear results.

Keywords: Extraction, Identification, Molecular, PCR, Softcoral

PENDAHULUAN

Karang lunak merupakan invertebrata multiseluler yang banyak dijumpai di ekosistem terumbu karang. Bentuk dan warnanya yang indah menjadikan karang ini primadona bagi para penyelam untuk dilihat. Tubuhnya yang lunak sangat mudah untuk diamati perbedaanya dengan karang keras. Hal ini dikarenakan karang lunak tidak membentuk terumbu. Tubuh karang ini terdapat sklerit atau zat kapur yang terkandung didalam tubuhnya. Sklerit ini berfungi untuk menopang dan memberi bentuk karang lunak agar tetap tegak.

Sklerit dalam tubuh karang lunak ini biasa digunakan sebagai karakterisasi dalam proses identifikasi morfologinya. Akan tetapi, dalam proses identifikasinya, penggunaan sklerit ini sangat menyulitkan peneliti karena variasi bentuknya yang sangat banyak. Selain itu juga penggunaan sklerit untuk identifikasi mengharuskan mengambil seluruh bagian karang lunak ini untuk dibedah. Oleh sebab itu metode ini tidak konservatif dalam pelaksanaanya. Penggunaan metode identifikasi yang tepat sangat membantu pelestarian karang lunak ini di alam. Salah satu metode identifikasi yang sedang berkembang saat ini adalah metode molekuler. Metode identifikasi menggunakan metode molekuler telah banyak dilakukan untuk identifikasi ikan kerapu (Tapilatu, 2020; Dwifajriani, 2022) dan hiu berjalan (Tapilatu, 2022). Sedangkan penggunaan analisis molekuler untuk karang lunak masih sangat kurang digunakan dalam proses identifikasi molekuler.

Metode molekuler ini memiliki beberapa tahap yang sangat penting dalam pelaksanaanya. Tahap tersebut ialah tahap ekstraksi dan tahap PCR (*Polymerase chain reaction*). Ekstraksi adalah tahap awal molekuler untuk memisahkan DNA dan sel-nya. Sedangkan PCR atau biasa dikenal dengan amplifikasi merupakan suatu metode untuk memperbanyak jumlah DNA yang didapatkan setelah tahap ekstraksi. Kedua metode ini merupakan metode yang menetukan berhasil tidaknya peneliti dalam melakukan identifikasi molekuler. Akan tetapi dalam pelaksanaan identifikasi molekuler karang lunak, kedua tahap ini masih banyak dijumpai kendala. Hal ini dikarenakan terdapat perbedaan tebal atau tipisnya jaringan pada spesies

yang berbeda pada hewan octocoralia ini. Oleh karena itu, perlu adanya optimasi metode yang tepat sehingga dapat menghasilkan kualitas dan kuantitas DNA yang bagus. Kualitas dan kuantitas DNA yang baik dapat ditentukan oleh jenis sampel, primer yang digunakan dan juga suhu annealing yang digunakan dalam tahap amplifikasi (PCR). Oleh karena itu, penting adanya penelitian yang mengkaji tentang konsentrasi hasil ekstraksi dan PCR yang optimal pada spesies karang lunak yang berbeda untuk memudahkan peneliti lainnya dalam proses identifikasi.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Karang lunak Pengambilan sampel karang lunak dilakukan dengan menggunakan alat scuba untuk mengambil jaringan karang lunak. Karang lunak yang akan di ambil di foto terlebih dahulu untuk proses identifikasi secara morfologi dan dilanjutkan pengambilan sampel jaringan. Sampel jaringan diambil dengan cara non-destruktif yaitu dengan mengambil jaringan karang lunak hanya sepanjang 5 - 7 cm. Jaringan karang lunak dipotong dengan menggunakan gunting, kemudian sampel yang telah didapatkan dibilas dengan menggunakan aquades steril. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan organisme simbion yang terdapat pada bagian permukaan jaringan karang lunak. Kemudian sampel dimasukan kedalam tube 1.5 ml dan diawaetkan menggunakan ethanol 96% pro analisis. Tahap berikutnya dilanjutkan dengan pemberian label menggunakan kertas kalkir.

Ekstraksi Jaringan Karang Lunak

Proses ekstraksi diawali dengan pencucian jaringan karang lunak sepanjang 0.5 cm dengan menggunakan aquades steril yang berguna untuk menghilangkan pengaruh ethanol. Jaringan yang telah dicuci kemudian dihaluskan dengan menggunakan *microsmash* untuk mempermudah dalam tahapan lisis jaringan. Jaringan yang telah halus kemudian diekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi Qiagen untuk darah dan jaringan. Inkubasi dilakukan dengan memberikan tiga perlakuan terhadap lama waktu inkubasi yaitu 3 jam pada temperatur 56°C. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan dengan mengikuti protokol dari kit qiaen. Proses ekstraksi dilakukan seluruhnya dengan prinsip steril yaitu dengan cara mencuci bersih dan membakar pisau, pinset maupun gunting yang telah dipakai pada setiap sampel.

Amplifikasi DNA dengan Menggunakan PCR

Hasil ekstraksi yang didapatkan kemudian dilanjutkan ketahap amplifikasi untuk memperbanyak DNA. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan urutan primer 16S647F: 5'-ACACAGCTCGGTTCTATCTACCA-3' dan ND21418R: 5'-ACATCGGGAGCC CACATA-3' untuk fragmen ND2. (Sanchez *et al.*, 2003). Primer ini mengamplifikasi DNA pada bagian mitokondria. Sebanyak 3 μ l DNA direaksikan dengan 12,5 μ l Q5 *high fidelity master mix*, 7 μ l ddH₂O, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1,25 μ l dengan total campuran 25 μ l. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan 2 perlakuan. Perlakuan pertama menggunakan urutan *pre-denaturation* pada suhu 98°C selama 30 detik, *denaturation* pada suhu 98°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 56°C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 30 serta final extention pada suhu 72°C selama 2 menit dalam 35 siklus. Sedangkan perlakuan kedua menggunakan urutan *pre-denaturation* pada suhu 98°C selama 30 detik, *denaturation* pada suhu 98°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 57°C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 30 serta final extention pada suhu 72°C selama 2 menit dalam 35 siklus. Penentuan perbedaan suhu *annealing* tersebut didasarkan selisih pada perhitungan asam basa pada primer *forward* dan *reverse* dengan rumus:

$$TA = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Ket :

TA	= Temperatur Annealing	G = Guanin
A	= Adenin	C = Cytosin
T	= Timin	

Uji Kualitatif DNA *Sinularia peculiaris*, *Lobophytum pauciloflorum*, *Sarcophyton trocheliophorum*, *Xenia* sp dengan menggunakan Nanodrop Spektrofotometer

Hasil ekstraksi kemudian dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan Nanodrop Spektrofotometer. Jumlah sampel hasil ekstraksi dan blanko yang digunakan yaitu sebanyak 1 μ l. Proses ini dimulai dari uji blanko kemudian sampel DNA dan kemudian terakhir penggunaan blanko kembali. Panjang gelombang yang digunakan yaitu A₂₆₀/A₂₈₀.

Visualisasi Hasil PCR dengan Menggunakan Metode Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa konsentrasi 1,5%. Komposisi gel tersebut yaitu pewarna *Etidium Bromidea* (4 μ l) dan larutan TAE 1X 100 ml dan agarose 1.5 gram. Kemudian larutan tersebut dididihkan dan dicetak kedalam cetakan yang memiliki sisiran untuk membentuk sumuran agarose. Hasil PCR sebanyak 4 μ l yang telah ditambahkan dengan *loading dye* (1 μ l), dimasukkan ke dalam sumur agarosa. Setelah itu di

elektroforesis pada tegangan 100 V selama 25 menit. Pita hasil elektroforesis dilihat dengan menggunakan sinar ultraviolet pada UV transilluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi

Hasil ekstraksi pada 12 sampel karang lunak lunak yang terdiri dari 4 jenis seperti *Sinularia peculiaris*, *Lobophytum pauciloflorum*, *Sarcophyton trocheliophorum*, *Xenia* sp mendapatkan berbagai rentang konsentrasi DNA. Hasil rentang konsentrasi DNA yang diperoleh dari 8.50 hingga 59.9 (ng/ul) (Tabel 1). Rata-rata konsentrasi DNA tertinggi pada jenis *Xenia* Sp. Sebesar 53.90 (ng/ul) di ikuti oleh *Sinularia peculiaris* sebesar 51.60 (ng/ul), *Lobophytum pauciloflorum* sebesar 48.56 (ng/ul) dan terkecil pada *Sarcophyton trocheliophorum* yaitu sebesar 26.70 (ng/ul). Tingginya konsentrasi DNA pada *Xenia* sp. dimungkinkan karena struktur jaringan karang lunak ini yang cenderung lebih lembek dibandingkan dengan spesies lain yang digunakan. Lunaknya jaringan *Xenia* sp, mempermudah dalam proses penghancuran sel dan pemisahan DNA dari selulosa dan protein, sehingga DNA mudah di terekstraksi. Berbeda dari *Xenia* sp, karang lunak *Sinularia peculiaris*, *Lobophytum pauciloflorum*, dan *Sarcophyton trocheliophorum* memiliki struktur tubuh yang cenderung lebih keras dari pada *Xenia* sp. Keberhasilan dari ekstraksi sangat tergantung dari jenis dan berat sampel tissue yang digunakan. Menurut keberhasilan dari ekstraksi DNA dapat dipengaruhi oleh tingkat struktur sel dari suatu organisme. Hal ini mengacu pada tujuan dari proses ekstraksi itu sendiri yaitu untuk memisahkan kandungan lipid, polisakarida dan protein (Liana, 2017).

Tabel 1. Hasil Uji Kualitatif Ekstraksi DNA menggunakan Nanodrop Spektrofotometer

Sampel	Rentang Konsentrasi DNA (ng/ul)	Rata-rata konsentrasi DNA (ng/ul)	Rentang Nilai A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Rata-rata Nilai Mean A ₂₆₀ /A ₂₈₀
<i>Sinularia peculiaris</i>	49.7 – 53.4	51.60	1.821–1.963	1.910
<i>Lobophytum pauciloflorum</i>	40.4 – 56.4	48.56	1.862–1.963	1.901
<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>	8.50 – 52.3	26.70	1.591–1.974	1.781
<i>Xenia</i> sp.	50.9 – 59.4	53.90	1.782–1.965	1.863

Berdasarkan pada rata-rata nilai mean A₂₆₀/A₂₈₀ sampel *Sarcophyton trocheliophorum* memiliki rata-rata yang paling kecil dibandingkan yang

DOI: <https://doi.org/10.31186/jenggano.7.2.175-182>

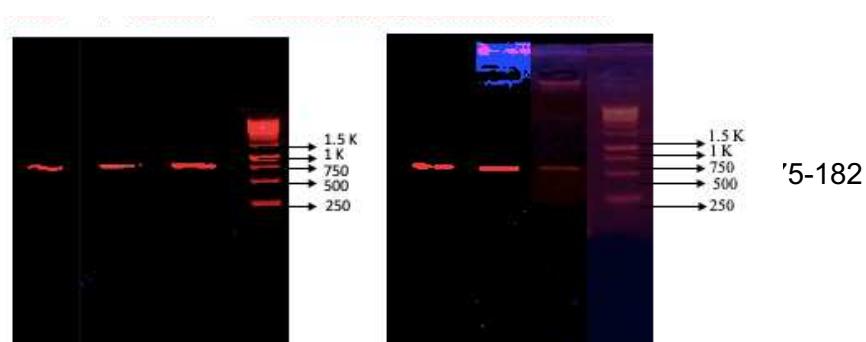
179

sampel yang lain yaitu 1.781. Hal ini dimungkinkan karena adanya kontaminasi pada hasil ekstraksinya. Tebalnya jaringan karang lunak jenis *Sarcophyton trocheliophorum* memungkinkan adanya kontaminasi protein didalamnya. Menurut (Fatchiyah et al., 2011; Kartini., 2012) nilai kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan adanya kontaminasi pada hasil ekstraksi yang berupa protein, karbohidrat atau fenol, sedangkan nilai lebih dari 2 telah terkontaminasi oleh RNA.

Hasil PCR

Hasil analisis amplifikasi DNA pada 4 spesies karang lunak *Sinularia peculiaris*, *Lobophytum pauciloflorum*, *Sarcophyton trocheliophorum*, *Xenia* sp. menunjukkan ketegasan pita DNA yang berbeda-beda. Pada karang lunak jenis *Sarcophyton trocheliophorum* masih terdapat sampel hasil amplifikasi yang smear (Gambar 1b). Smear pada pita DNA hasil amplifikasi dimungkinkan karena adanya kontaminasi zat-zat seperti fenol, polisakarida dan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh karang lunak itu sendiri. Menurut Nur et al, 2019 dan Sawant et al., 2006 karang lunak memiliki metabolit sekunder yang berfungsi sebagai racun untuk melawan predator yang mengancam kelangsungan hidupnya. Smear yang dihasilkan pada proses elektroforesis disebabkan oleh 2 kemungkinan, yaitu adanya kontaminasi pada produk DNA dan adanya degradasi pada DNA (Mulyani et al., 2011). Adanya degradasi produk DNA yang dihasilkan dimungkinkan karena proses ekstraksi yang kurang baik sehingga menyebabkan terputusnya ikatan antar molekul DNA. Misalnya saat proses penggerusan tissue maupun karena temperatur suhu yang terlalu tinggi saat inkubasi (Sisharmini et al., 2001; Prayitno et al., 2011; Harahap, 2018). Hal ini sesuai dengan hasil rata-rata konsentrasi DNA yang didapat yaitu kurang dari 1.8 yang mengindikasikan adanya kontaminasi pada proses ekstraksi.

Hasil amplifikasi pada jenis karang lunak *Sinularia peculiaris* menunjukkan bahwa pita DNA yang dihasilkan tidak terlalu tebal (Gambar 1c). Tipisnya pita DNA pada sampel ini dimungkinkan karena adanya degradasi pada sampel ekstraksinya. Menurut Biorad (2022) bahwa hasil pita DNA yang tipis pada proses amplifikasi dimungkinkan karena waktu siklus dan suhu amplifikasi yang tidak sesuai, selain itu komposisi PCR seperti banyaknya cetakan DNA yang digunakan juga berpengaruh pada hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA yang tinggi pada cetakan DNA yang digunakan pada amplifikasi dapat mengganggu proses amplifikasi. Hal ini sesuai dengan hasil konsentrasi DNA pada proses ekstraksi yang tinggi pada sampel karang lunak *Sinularia peculiaris*. Oleh karena itu harus ada penyesuaian banyaknya jumlah cetakan DNA yang digunakan pada amplifikasi sesuai dengan konsentrasi hasil ekstraksi DNA.



Gambar 1. (a) Pita DNA hasil ampilifikasi pada *Xenia* sp. (b) Pita DNA hasil ampilifikasi pada *Sarcophyton trocheliophorum*. (c) Pita DNA hasil ampilifikasi pada *Sinularia peculiaris*. (d) Pita DNA hasil ampilifikasi pada *Lobophytum pauciflorum*

Hasil pita paling baik ditunjukan pada sampel karang lunak *Xenia* sp. dan *Lobophytum pauciflorum* (Gambar 1 a dan d). Hal ini ditunjukan dengan tebal dan tegasnya pita DNA yang dihasilkan. Menurut Sauer et al, 1998 kualitas DNA yang baik yaitu pita DNA menunjukan pita yang tegas, tebal (berat molekul yang tinggi) dan tidak ada atau sedikit DNA yang smear jika di dalam pengamatan menggunakan sinar ultraviolet menggunakan UV transilluminator. Pita Tegas dan sedikit tebal akan dipengaruhi oleh konsentrasi DNA yang dihasilkan pada ekstraksi. Konsentrasi yang telalu banyak akan sulit dibedakan penampakan pita DNA, sedangkan konsentrasi DNA terlalu kecil akan berdampak pada pita DNA yang tipis atau bahkan tidak dapat terlihat ketika disinari sinar ultraviolet.

KESIMPULAN

Hasil ekstraksi setelah di ujikan pada nanodrop spektrofotometer menunjukan bahwa sampel karang lunak jenis *Xenia* sp memiliki konsentrasi DNA yang tertinggi dengan nilai 53.90 (ng/ul) dan terendah pada jenis *Sarcophyton trocheliophorum* sebesar 26.70 (ng/ul). Tingginya konsentrasi DNA pada karang lunak jenis *Xenia* sp. dimungkinkan karena dari karakter *tissue* karang ini yang lebih lunak sehingga mudah di ekstraksi sedangkan rendahnya konsentrasi DNA ini dimungkinkan karena adanya kontaminasi pada hasil ekstraksi. Optimalisasi PCR menghasilkan hasil yang baik pada spesies *Xenia* sp., dan *Lobophytum pauciflorum* sedangkan DOI: <https://doi.org/10.31186/jenggano.7.2.175-182> 181

pada sampel jenis *Sarcophyton trocheliophorum* pita DNA menunjukkan hasil yang smear.

DAFTAR PUSTAKA

- BIORAD. 2022. *PCR troubleshooting*. www.researchgate.net. Diakses pada tanggal 18 September 2021.
- Dwifajri, S., R. F. Tapilatu., B. Pranata., A. B. Kusuma. 2022. Molecular phylogeny of grouper of *Epinephelus* genus in Jayapura, Papua, Indonesia inferred from Cytochrome Oxidase I (COI) gene. *Biodiversitas*. 23(3): 1449-1456
- Fatchiyah, A., Widyarti, L. E., & Rahayu, S. 2011. *Biologi molekular prinsip dasar analisis*. Malang: Erlangga.
- Harahap, A. S. 2018. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatra. *Jurnal of Animal Science and Agronomy*, 2(2), 1–6.
- Kartini, A. R. 2012. *Karakterisasi molekuler padi trasgenik dengan beberapa metode isolasi DNA*. Skripsi. Departemen Biokimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Liana, H.A. 2017. Isolasi DNA Chlorella sp. dengan metode CTAB dan identifikasi sekuens 18s rDNA. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas sains teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mulyani, N. A., Purwanto, I., & Nurruhwati. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHU) pada ikan mas (*Crypinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 7(1).
- Nur, RM., M, Mu'nisa, A., Hala, Y. 2019. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Karang Lunak *Lobophytum* sp. *Jurnal Bionature*. 20 (1): 57-63
- Prayitno, E., & Nuryandani. 2011. Optimalisasi ekstraksi DNA jarak pagar (*Jatropha curcas*) melalui pemilihan daun yang sesuai. *Bioteknologi*, 8(1), 24– 31.
- Sauer, P. M., Muller, & Kang, J. 1998. Quantitation DNA. *Qiagen News*, 2(1), 23– 26
- Sawant, S., Youssef, D., Mayer, A., Sylvester, P., Wali, V. dan Arant, M.S.K.EI. 2006. Anticancer and Anti-inflammatory Sulfur-containing Semisynthetic Derivatives of Sarcophine. *Chem. Pharm. Bull.*, 54: 1119–1123