

Analisis DNA Hasil Isolasi Pada Produk Pangan Olahan Ikan (Surimi Ikan) Menggunakan Nano Photometer

Analysis of Isolated DNA in Processed Fish Food Products (Fish Surimi) Using a Nano Photometer

Sofia Dyah Utami^{1*}, Sri Utaminingsih², Alfi Sophian³

^{1,2,3}Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional
Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta, Indonesia
Jl. Percetakan Negara, No. 23, Jakarta Pusat, 10560, Indonesia

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

DOI:

10.30595/jrst.v7i1.15180

Histori Artikel:

Diajukan:

29/09/2022

Diterima:

06/12/2022

Diterbitkan:

01/03/2023

ABSTRAK

Analisis mutu DNA untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi merupakan sebuah teknik analisis yang dapat digunakan untuk mendukung pengujian bidang biologi molekuler yang menggunakan instrumen PCR atau *real-time* PCR. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kualitas DNA hasil isolasi pada sampel produk pangan olahan ikan. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi yang mendukung penelitian di bidang molekuler pada ruang lingkup pengawasan mutu dan autentifikasi pada produk pangan olahan ikan. Analisis DNA hasil isolasi dianalisis menggunakan *NanoPhotometer* untuk mengukur nilai konsentrasi dan kemurnian dengan panjang gelombang A260/A280. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran kemudian diinterpretasikan menggunakan nilai uji rata-rata untuk menganalisis mutu DNA hasil isolasi. Data hasil penelitian menunjukkan nilai konsentrasi DNA berada pada kisaran 14,5 – 17,8 dengan rata-rata nilai konsentrasi berada pada 16,1. Untuk nilai kemurnian DNA hasil isolasi berada pada kisaran 1,89 – 2,07 dengan rata-rata nilai kemurnian berada pada 1,97. Dengan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa hasil isolasi DNA yang diukur menggunakan nano fotometer menunjukkan nilai kualitas DNA hasil isolasi yang baik.

Kata Kunci: Analisis, DNA, Ikan, Isolasi, Surimi

ABSTRACT

DNA quality analysis to see the quality of isolated DNA is an analytical technique that can be used to support testing in the field of molecular biology using PCR or real-time PCR instruments. The purpose of this study was to analyze the quality of DNA isolated from samples of processed fish food products. Besides that, this research is also expected to be a source of information that supports research in the molecular field in the scope of quality control and authentication of processed fish food products. Analysis of the isolated DNA was analyzed using a NanoPhotometer to measure the concentration and purity values with a wavelength of A260/A280. The data obtained from the measurement results are then interpreted using the average test value to analyze the quality of the isolated DNA. The research data showed that the DNA concentration value was in the range of 14.5 – 17.8 with an average concentration value of 16.1. The purity value of isolated DNA was in the range

of 1.89 – 2.07 with an average purity value of 1.97. With these results, it can be concluded that the results of DNA isolation measured using a nano photometer showed a good value for the quality of the isolated DNA.

Keywords: Analysis, DNA, Fish, Isolation, Surimi

1. PENDAHULUAN

Analisis mutu DNA untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi merupakan sebuah teknik analisis yang dapat digunakan untuk mendukung pengujian bidang biologi molekuler yang menggunakan instrumen PCR atau real-time PCR. Perkembangan dunia biologi molekuler melahirkan banyak bidang biologi terapan yang menggunakan teknik biologi molekuler untuk melakukan pengujian mutu suatu produk dengan menggunakan parameter deteksi DNA spesies atau uji autentifikasi (Sophian, 2021).

Penelitian tentang analisis mutu atau kualitas DNA hasil isolasi telah dilakukan terhadap beberapa produk makanan olahan seperti pada produk olahan kedelai (DiBernardo et al. 2007), ikan asin (Sophian, 2021), kepiting (Sophian et al. 2021), Tomat (Piskata et al. 2019). Perkembangan teknik isolasi DNA melahirkan banyak kit dengan metode ekstraksi yang membutuhkan optimasi awal sebelum metode tersebut digunakan. Keberhasilan optimasi akan mendukung keberhasilan analisis pada saat melakukan pengujian. Optimasi dilakukan untuk mengetahui tingkat keakuratan dan keefektifan sebuah kit yang akan digunakan. Salah satu cara untuk mengetahui keberhasilan optimasi dalam ekstraksi adalah dengan melakukan analisis mutu DNA hasil isolasi menggunakan *NanoPhotometer*.

Maka berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menganalisis kualitas DNA hasil isolasi pada sampel produk pangan olahan ikan, sehingga dapat menjadi sumber acuan pada penelitian sejenis. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi yang mendukung penelitian di bidang molekuler pada ruang lingkup pengawasan mutu dan autentifikasi pada produk pangan olahan ikan.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi produk pangan olahan daging ikan berupa Surimi Ikan, Kit Ekstraksi Dneasy Mericon Food [Qiagen], Air bebas nukleotida.

2.2. Prosedur Ekstraksi DNA

Prosedur Isolasi DNA dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 20 mg kemudian dimasukkan kedalam *centrifuge tube* 2 ml kemudian ditambahkan 200 μ L *lysis buffer* dan 30 μ L proteinase K. Tahapan selanjutnya dilanjutkan dengan inkubasi sampel pada suhu 70 °C selama 60 menit sambil dimixer pada kecepatan 1400 rpm. Setelah tahapan tersebut selesai, dilanjutkan dengan sentrifugasi sampel pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit. Siapkan *centrifuge tube* 2 ml yang bersisi 500 μ L kloroform, kemudian pindahkan supernatan sampel yang telah disentrifugasi kedalam *centrifuge tube*. Vorteks campuran supernatan sampel dan kloroform selama 15-20 detik, setelah itu dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 10 menit. Pindahkan 350 μ L supernatan kedalam *centrifuge tube* 2 mL yang baru kemudian ditambahkan 350 μ L buffer PB dan dihomogenisasi dengan cara di vortex selama 15-20 detik kemudian dimasukan kedalam *spin column*, dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm, buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* kedalam *collection tube* yang baru kemudian tambahkan buffer AW2 sebanyak 650 μ L dan disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* kedalam *centrifuge tube* 1,5 dan tambahkan elusi buffer AE sebanyak 100 μ L, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Buang *spin column*, simpan DNA hasil isolasi yang ada pada *centrifuge tube* 1,5 didalam freezer -20 °C (Qiagen, 2020).

2.3. Analisis DNA Hasil Isolasi

Analisis DNA hasil isolasi dianalisis menggunakan *NanoPhotometer* untuk mengukur nilai konsentrasi dan kemurnian dengan panjang gelombang A260/A280. (Sophian, 2021; Sophian et al, 2021; Sophian & Syukur 2021; Wulan et al 2021; Sutanta et al. 2022).

2.4. Analisis Data

Data hasil *NanoPhotometer* kemudian dianalisis dengan cara melakukan uji rata-rata terhadap nilai kemurnian dan konsentrasi DNA hasil Isolasi (Sophian 2021; Sophian et al 2021; Sophian & Syukur 2021).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi DNA diperoleh nilai konsentrasi DNA berada pada kisaran 14,5 – 17,8 dengan rata-rata nilai konsentrasi berada pada 16,1. Untuk nilai kemurnian DNA hasil isolasi berada pada kisaran 1,89 – 2,07 dengan rata-rata nilai kemurnian berada pada 1,97. Data lengkap seperti tersaji pada table (1) dibawah ini.

Tabel 1. Pengukuran Hasil Isolasi DNA

No	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (A260/A280)
1	15,6	2,07
2	17,8	1,90
3	17,0	1,96
4	15,8	1,90
5	16,8	1,96
6	17,1	1,89
7	16,3	1,98
8	14,5	2,03
9	15,3	2,07
10	15,0	1,99
Rata-Rata	16,1	1,97

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa nilai kemurnian optimum DNA pada panjang gelombang A260/A280 berada pada kisaran 1.8-1.9, sedangkan RNA berapa pada kisaran 1.9-2.0 (Eppendorf 2016), pada rentang 1.8-2 (Kriby 1990; Sambrook, 1989) yang menyatakan bahwa hasil ekstraksi DNA. Jika dilihat dari tabel 1 diatas, untuk nilai kemurnian yang terbaca pada panjang gelombang A260/A280 menunjukkan nilai 1,97. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa DNA hasil ekstraksi tidak masuk dalam rentang DNA yang baik, akan tetapi untuk menyimpulkan suatu sampel hasil ekstraksi bisa diuji menggunakan real-time PCR maka nilai kemurnian dan konsentrasi yang menjadi patokan isolasi dikatakan baik tadi masih bisa dikesampingkan karena perkembangan teknologi real-time PCR memungkinkan jika proses amplifikasi dapat terjadi dengan konsentrasi yang rendah sekalipun tergantung pada sensitifitas sebuah alat PCR (Sophian 2021; Sophian et al., 2021).

Analisis kemurnian dan konsentrasi di baca menggunakan nano fotometer dengan mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang A260/A280. Penggunaan panjang gelombang A260/A280 merupakan metode umum dalam mendeteksi nilai konsentrasi dan kemurnian DNA (Sophian, 2021). Leninger (1975), mengungkapkan bahwa dari 5 komposisi nukleotida penyusun DNA atau RNA jika dibaca absorbansinya pada panjang gelombang A260/A280 akan menunjukkan nilai yang bervariasi, yaitu: guanine (1.15), adenin (4.50), sitosin (1.51), urasil (4.00) dan timin (1.47). Hasil analisis kemurnian yang dihasilkan dari pembacaan absorbansi merupakan rata-rata dari nilai absorbansi empat atau lima asam nukleat ini. Inilah yang menjadi dasar penetapan nilai kemurnian umumnya untuk analisis DNA berada pada kisaran (1.8-2.0), sedangkan untuk RNA nilai kisaran akan lebih besar dari nilai tersebut dikarenakan pada RNA salah komponen penyusunnya adalah urasil yang jika dibandingkan dengan DNA yang disusun oleh timin maka urasil memiliki nilai yang lebih tinggi yaitu (4.00), sehingga jika dirata-rata maka nilai kemurniannya akan lebih tinggi jika dibandingkan dengan DNA.

Dalam melakukan ekstraksi DNA yang menggunakan sistem ekstraksi *Phenol-Chloroform*, umumnya terdiri atas tiga proses, yaitu lisis sel, purifikasi, dan presipitasi. Tahapan lisis dilakukan dengan bantuan enzim proteinase K dan Sodium Dodecyl Sulfat (SDS). Dimana pada tahapan ini, SDS akan melisis lemak dan protein sehingga isi dalam membran sel keluar. Pada tahapan lisis, ikubasi dilakukan pada suhu 70°C. Tujuan pemanasan ini adalah mengaktivasi enzim proteinase K agar dapat aktif bekerja untuk melakukan lisis (Renshaw. 2015). Sistem ekstraksi *Phenol-Chloroform* bekerja dengan prinsip menggunakan fenol untuk mengikat protein, lemak dan karbohidrat, yang selanjutnya akan dipisahkan dengan makromolekul lainnya. Pada saat dilakukan sentrifugasi, makromolekul seperti protein dan polisakarida yang diikat oleh fenol dan Kloroform Isoamil Alkohol akan mengendap di dasar tabung, sedangkan DNA dan air berada di lapisan atas (Kado, et al. 1981). Untuk memisahkan memurnikan DNA tersebut dilakukan dengan cara sentrifugasi 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. Untuk menarik pelet DNA dari spin kolom ini dapat menggunakan akuades steril atau *nucleotida-free water*.

Pada tahapan ekstraksi DNA, enzim proteinase K memegang peran yang cukup penting. Enzim proteinase K hanya akan aktif bekerja saat inkubasi terjadi pada suhu 65-70 °C. Oleh sebab itu, pada beberapa penelitian yang menggunakan metode ini terkadang perlu melakukan optimasi metode sebelum menggunakannya. Penelitian yang dilakukan oleh Christensen (2012) menunjukkan bahwa tersebut diketahui bahwa pada suhu 65 °C, lisis akan bekerja dengan baik saat diinkubasi selama 3 jam atau lebih. Jika waktu inkubasi dibawah 3 jam maka proses lisis tidak dapat berlangsung secara tuntas.

Setiap PCR memiliki kemampuan deteksi limit deteksi yang berbeda-beda berkisar antara 0,01-2 p/μL, (Perandin et al 2004; Cnops et al 2011; Kamau et al 2013; Xu et al 2015; Srisutham et al 2017). Pentingnya analisis mutu DNA hasil isolasi sebelum melakukan pengujian menggunakan PCR atau *real-time* PCR merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan sebuah proses pengujian molekuler. Untuk itu setiap kali melakukan pengujian diperlukan langkah awal optimasi sampel dan kit yang digunakan sehingga pengujian yang dilakukan bisa efektif dan efisien. Karakter kit ekstraksi dan matriks sampel yang digunakan sangat erat kaitannya dengan keberhasilan proses isolasi DNA.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan kualitas DNA hasil isolasi yang baik dengan nilai konsentrasi berada pada 16,1 ng/ μL, dan nilai kemurnian yang dibaca pada panjang gelombang A260/A280 berada pada 1,97.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terimakasih atas dukungan fasilitas yang diberikan oleh kepala Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

Christensen, L., Bertram HC., Aaslyng MD., Christensen M. 2012. Protein denaturation and water- protein interactions as affected

by low temperature long time treatment of porcine longissimus dorsi. *Journal of Meat Science*. Volume 88, Issue 4

Cnops L, Jacobs J, Van Esbroeck M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(7): 1101-7.

DiBernardo, G., DelGaudio, S., Galderisi, U., Cascino, A., & Cipollaro, M. (2007). Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. *Biotechnology Progress*, 23(2), 297–301. <https://doi.org/10.1021/bp060182m>

Eppendorf. 2016. Nucleic Acid Photometry. Check of critical parameters. Eppendorf AG • 22331 Hamburg • Germany • eppendorf@eppendorf.com • www.eppendorf.com

Kado, C.I dan S.T. Liu. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*. 145 (3), 1365-1373.

Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of Malaria. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71539.

Kirby L.T. 1990. DNA Fingerprinting: An Introduction. M. Stockton Press. New York.

Leninger A.L. 1975. Biochemistry, 2nd ED. Worth Publishers, New York.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Medici MC, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3): 1214.

Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules*, 24(6), 1188. <https://doi.org/10.3390/molecules24061188>

Qiagen. 2020. DNeasy® mericon® Food Handbook. For extraction of total nucleic acids from a range of food sample types. www.qiagen.com/shop. Technical Support

- support.qiagen.com. Website
www.qiagen.com.
- Sambrook J, Fritsch F, Miniatis T. 1989. Molecular Cloning Laboratory Manual. 3rd edition. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Sophian, A. 2021. Short Communication: Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry*, 19(1).
<https://doi:10.13057/biofar/f190104>
- Sophian, A. 2021. Detection of Species DNA in Chicken Meatball Products Using NGF Genes as Molecular Markers. *BiosciED: Journal of Biological Science and Education*, 2(2), 47–51.
<https://doi.org/10.37304/bed.v2i2.3422>
- Sophian, A., & Syukur, A. 2021. Analysis of Purity and Concentration of Isolated DNA in Making Raw DNA of Rat Species. *Eruditio : Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 1(2), 1–5.
<https://doi:10.54384/eruditio.v1i2.75>
- Sophian A, Purwaningsih R, Muindar, Igrisa E,P,J, & Amirullah M,L. 2021. Short Communication: Analysis of purity and concentration of DNA extracted from intron patho gene-spin extraction on crab processed food product samples. *Asian J Trop Biotechnol* 18: 13-27.
- Srisutham S, Saralamba N, Malleret B, Re L. Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175771.
- Sutanta, M., Wulan, D. T., Nabila, Y., & Sophian, A. 2022. 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. *Eruditio : Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 2(1), 14–19. Retrieved from
<https://eruditio.pom.go.id/index.php/home/article/view/78>
- Xu W, Morris U, Aydin-Schmidt B, Msellem MI, Shakely D, Petzold M. 2015. SYBR green real-time PCR-RFLP assay targeting the Plasmodium cytochrome B gene - A highly sensitive molecular tool for malaria parasite detection and species determination. *PLoS One*. 10(3): e0120210.
- Wulan DT, Sutanta M, Sophian A. 2021. Short Communication: Comparison of two commercial DNA extraction kit to obtain high quality porcine DNA. *Asian J Trop Biotechnol* 18: 69-72.