

SNSU PK.B-01:2024

# Pedoman Ekstraksi DNA dalam Matriks Pangan dan Pakan



## **PEDOMAN EKSTRAKSI DNA DALAM MATRIKS PANGAN DAN PAKAN**

Penyusun:

1. Umi Nuraeni
2. Dini Apriori
3. Rika Dwi Susmiarni
4. Muhammad Malhan Amin
5. Rosalin Damacena

Reviewer:

1. Dr. drh. Tati Ariyanti, MP – Pusat Riset Veteriner BRIN
2. Dr. Puji Rahayu – BPMSPH

Desain sampul:

1. Bagus Muhammad Irvan
2. Muhammad Malhan Amin

**Direktorat Standar Nasional Satuan Ukuran Mekanika, Radiasi, dan Biologi**  
**Badan Standardisasi Nasional**

Hak cipta © Badan Standardisasi Nasional, 2024

## Lembar Pengesahan

Pedoman Ekstraksi DNA dalam Matriks Pangan dan Pakan (SNSU PK.B-01:2024) diterbitkan oleh Badan Standardisasi Nasional sebagai panduan bagi laboratorium uji untuk melakukan ekstraksi DNA. Pedoman ini disusun berdasarkan standar nasional, standar internasional dan sumber ilmiah lainnya melalui proses pembahasan internal dengan mempertimbangkan masukan para ahli.

Dokumen ini diterbitkan secara bebas dan tidak untuk diperjualbelikan. Bagian dari dokumen ini dapat dikutip untuk keperluan edukasi atau kegiatan ilmiah dengan menyebutkan sumbernya.

Disahkan tanggal 31 Desember 2024

Deputi Bidang Standar Nasional Satuan Ukuran  
Badan Standardisasi Nasional

Y. Kristianto Widiwardono

## Daftar Isi

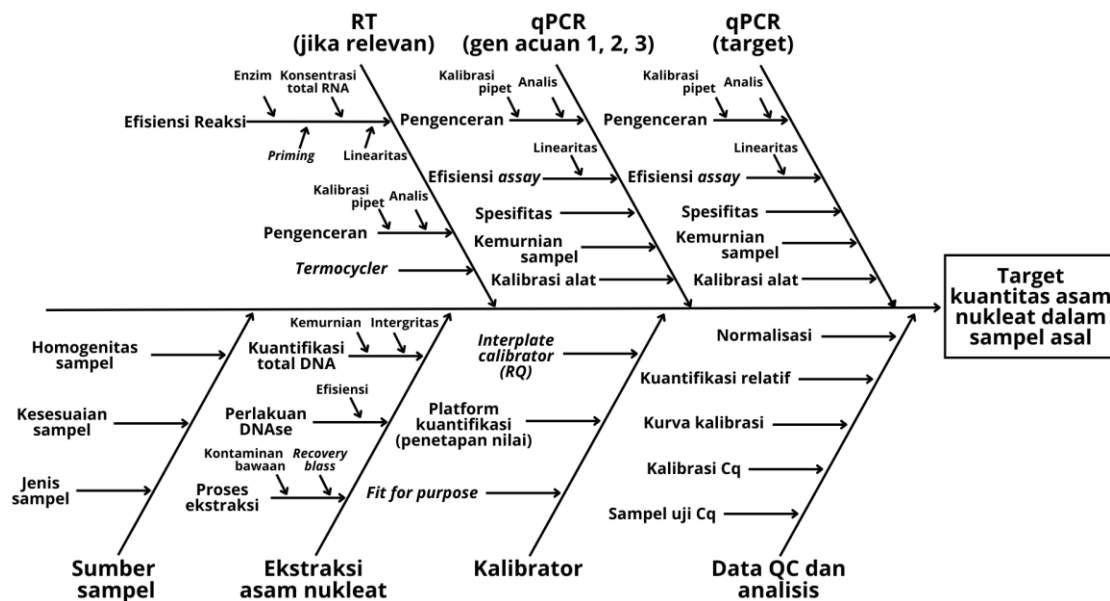
Daftar Isi .....	i
Daftar Gambar .....	ii
1. Pendahuluan.....	1
2. Ruang Lingkup.....	1
3. Definisi.....	1
4. Persyaratan Umum.....	4
4.1. Area Kerja Laboratorium .....	4
4.2. Kompetensi Personel .....	6
4.3. Peralatan Laboratorium.....	6
4.3. Perekasi .....	7
5. Prinsip Kerja .....	7
5.1. Ketentuan Umum .....	7
5.1.1. Pemilihan Metode.....	7
5.1.2. Penyiapan Sampel .....	8
5.2. Peralatan dan Perekasi .....	9
5.2.1. Peralatan .....	9
5.2.2. Perekasi .....	10
5.3. Ekstraksi/Purifikasi DNA .....	11
5.4. Kontrol .....	12
5.5. Kuantifikasi Total DNA dan Kemurnian DNA .....	13
5.5.1. Spektrofotometri UV .....	13
5.5.2. Fluorometri .....	14
5.5.3. qPCR/dPCR.....	14
5.6. Integritas DNA.....	16
5.7. Penyimpanan dan Penanganan DNA Pasca-Ekstraksi.....	16
5.8. Pemantauan Kontaminasi DNA.....	16
Daftar Pustaka .....	18

## Daftar Gambar

Gambar 1. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kualitas asam nukleat dalam pengukuran berbasis qPCR.....	1
Gambar 2. Diagram alir rekomendasi arah <i>flow</i> penggunaan area kerja selama proses pra-PCR, PCR, dan pasca-PCR.....	5
Gambar 3. Cara pengambilan sampel udara dan <i>swab</i> permukaan .....	17

## 1. Pendahuluan

Hasil analisis DNA yang akurat dan valid salah satunya dipengaruhi oleh proses ekstraksi DNA dari sampel yang didapatkan melalui beberapa tahapan sehingga diperoleh kemurnian, konsentrasi, dan integritas DNA yang memenuhi persyaratan. Hal ini menjadi tantangan bagi personel laboratorium untuk mengendalikan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kualitas DNA tersebut. Oleh karena itu, penting bagi laboratorium untuk memperhatikan faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi DNA agar hasilnya memenuhi persyaratan [1].



Gambar 1. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kualitas asam nukleat dalam pengukuran berbasis qPCR [1]

## 2. Ruang Lingkup

2.1. Pedoman ini mencakup persyaratan area kerja laboratorium, kompetensi personel, peralatan, pereaksi, ketentuan umum ekstraksi DNA, proses ekstraksi/purifikasi DNA, kontrol pengujian, kuantifikasi total DNA dan kemurnian DNA, serta integritas DNA

2.2. Pedoman ini terbatas untuk sampel pangan dan pakan

## 3. Definisi

Untuk keperluan interpretasi dalam Pedoman Ekstraksi DNA dalam Matriks Pangan dan Pakan ini, berlaku istilah dan definisi yang diberikan dalam SNI ISO 20395 [1], ISO 22174 [2], ISO 13495 [3], ISO 24276:2006 [4].

- 3.1. amplikon  
fragmen DNA spesifik yang dihasilkan oleh teknologi amplifikasi DNA (3.2) seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (3.14)
- 3.2. asam deoksiribonukleat (DNA)  
polimer deoksiribonukleotida yang dapat berupa untai ganda (dsDNA) atau untai tunggal (ssDNA)
- 3.3. asam ribonukleat (RNA)  
polimer ribonukleotida yang dapat berupa untai ganda atau untai tunggal
- 3.4. bahan acuan  
bahan yang cukup homogen dan stabil dengan satu atau lebih sifat yang ditentukan, yang telah ditetapkan agar sesuai penggunaan yang dimaksudkan dalam proses pengukuran
- 3.5. digital PCR (dPCR)  
metode yang dapat menunjukkan jumlah partisi yang mengandung *template* (3.20) target berdasarkan sinyal positif dan negatif. Prosedur ini dilakukan dengan mendistribusikan *template* asam nukleat ke beberapa partisi dengan volume yang setara, sehingga beberapa partisi dapat mengandung *template* dan tidak, lalu dilakukan amplifikasi untuk mendeteksi sekuen target tersebut.
- 3.6. DNA komplementer (cDNA)  
DNA untai tunggal, komplementer dengan RNA (3.3) tertentu dan disintesis oleh *reverse transcriptase* sebagai *template* (3.20) untuk amplifikasi DNA (3.2).
- 3.7. efisiensi PCR  
fraksi molekul yang diamplifikasi dalam setiap siklus PCR (3.14)
- 3.8. elektroforesis  
metode pemisahan partikel bermuatan listrik berdasarkan perbedaan migrasi di bawah pengaruh medan listrik
- 3.9. kalibrator  
standar pengukuran yang digunakan dalam kalibrasi
- 3.10. kontrol ekstraksi positif  
kontrol yang digunakan untuk menunjukkan bahwa prosedur ekstraksi DNA (3.2) dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA target
- 3.11. kontrol ekstraksi negatif / blanko ekstraksi  
kontrol yang mendapatkan semua perlakuan prosedur ekstraksi kecuali penambahan porsi uji (3.15)

### 3.12. kontrol lingkungan

kontrol yang digunakan untuk menentukan tidak adanya kontaminasi asam nukleat, misalnya dari udara di laboratorium

Catatan: Kontrol lingkungan menggunakan *tube* berisi air bebas asam nukleat (NFW) dengan volume tertentu dan dibiarkan terpapar udara selama keseluruhan proses

### 3.13. matriks

semua komponen yang terkandung pada sampel

### 3.14. *polymerase chain reaction* (PCR)

prosedur enzimatik untuk melakukan amplifikasi DNA (3.2) secara *in vitro*

### 3.15. porsi uji

sampel representatif (volume atau massa) yang diambil dari sampel laboratorium

### 3.16. purifikasi DNA

metode yang menghasilkan DNA (3.2) yang lebih murni

### 3.17. *quantitative real-time PCR* (qPCR)

Prosedur enzimatik yang mengombinasikan amplifikasi segmen DNA spesifik secara *in vitro* dengan deteksi dan kuantifikasi dari produk PCR (3.14) spesifik selama proses amplifikasi

### 3.18. sampel

porsi atau kuantitas kecil, diambil dari suatu populasi atau lot yang mewakili keseluruhan populasi atau lot tersebut

### 3.19. sampel uji

sampel yang disiapkan untuk pengujian atau analisis, yang seluruh jumlah atau sebagiannya digunakan untuk pengujian atau analisis dalam satu waktu

### 3.20. *template*

untai DNA atau RNA yang menentukan sekuens basa untai DNA (3.2) atau RNA (3.3) yang baru disintesis, kedua untai tersebut komplementer

### 3.21. total asam nukleat

total kuantitas asam nukleat dalam sampel setelah ekstraksi asam nukleat dan dinyatakan dalam konsentrasi massa



## 4. Persyaratan Umum

### 4.1. Area Kerja Laboratorium

Area kerja laboratorium merupakan salah satu faktor yang dapat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi DNA yang dilakukan, terutama dalam hal terjadinya kontaminasi terhadap DNA terekstraksi. Oleh karena itu, area kerja laboratorium perlu diperhatikan untuk mencegah terjadinya kemungkinan kontaminasi tersebut. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pencegahan kontaminasi ini, yaitu:

#### 4.1.1. Pemisahan area kerja laboratorium

Pemisahan area kerja laboratorium secara fisik merupakan cara yang paling efektif dan lebih direkomendasikan untuk mencegah kontaminasi, yang dilakukan dengan menetapkan pembagian area kerja [5].

Area kerja laboratorium dibagi menjadi minimal empat area yang terpisah, dengan flow kerja dapat dilihat pada [Gambar 2](#) [2].

##### a. Area kerja 1: Tahap preparasi *master mix* (pra-PCR)

Preparasi reagen dan *master mix* (termasuk primer, probe, dNTP, dan NTC)

##### b. Area kerja 2: Tahap preparasi sampel (pra-PCR)

Preparasi sampel yang dilakukan antara lain:

- Preparasi sampel uji
- Ekstraksi/purifikasi asam nukleat dari sampel uji
- Penambahan ekstrak asam nukleat ke dalam *master mix* untuk dianalisis
- Preparasi bahan acuan

Preparasi bahan yang memiliki konsentrasi sel/asam nukleat tinggi (misalnya kontrol positif) lebih baik dilakukan pada waktu dan bagian area kerja yang berbeda.

##### c. Area kerja 3: Tahap amplifikasi (PCR)

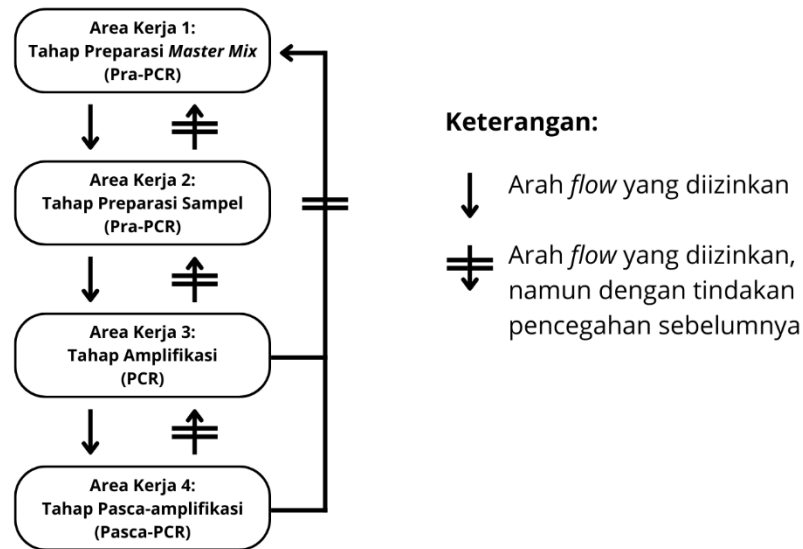
Khusus untuk real-time PCR, tahapan terdiri dari amplifikasi, deteksi, dan konfirmasi sekuen.

*Tube* yang berisi produk hasil amplifikasi harus tetap berada di dalam area kerja ini. Perlu diperhatikan bahwa pada zona ini berpotensi terjadinya kontaminasi oleh amplikon.

##### d. Area kerja 4: Tahap pasca-amplifikasi (pasca-PCR)

Area ini digunakan untuk deteksi dan berbagai macam perlakuan terhadap amplikon (elektroforesis dan pengambilan gambar, hibridisasi, digesti, atau

metode lain). Area kerja ini tidak diperlukan jika tidak terdapat perubahan terhadap amplikon.



Gambar 2. Diagram alir rekomendasi arah *flow* penggunaan area kerja selama proses pra-PCR, PCR, dan pasca-PCR [2]

#### 4.1.2. Pengendalian aliran udara dalam ruangan laboratorium

Aliran udara di dalam ruangan laboratorium perlu untuk diperhatikan untuk mencegah masuknya debu atau amplikon dari area kerja dengan risiko kontaminasi yang tinggi ke tempat kerja dengan risiko kontaminasi yang lebih rendah [5]. Aliran udara tidak boleh memungkinkan sirkulasi udara dari area pasca-PCR ke area pra-PCR. Jika memungkinkan, suplai dan pembuangan udara pada masing-masing area kerja dibuat terpisah. Hindari tekanan aliran udara negatif di area kerja 1 dan tekanan aliran udara positif di area kerja 2, 3, dan 4 [2].

#### 4.1.3. Meja kerja untuk kegiatan ekstraksi

Proses ekstraksi sebaiknya dilakukan di dalam kabinet dengan ultraviolet (UV) [2]. Apabila tidak dilakukan di dalam kabinet dengan UV, maka harus dipastikan bahwa meja kerja untuk ekstraksi DNA tahan terhadap cairan yg bersifat asam, tidak bersifat korosif dan mudah dibersihkan. Meja kerja dibersihkan sebelum dan setelah digunakan dengan larutan hipoklorida atau klorin 0,5 % dilanjutkan dengan etanol 70 %.

#### 4.2. Kompetensi Personel

Personel laboratorium harus memiliki kemampuan dan pemahaman sebagai berikut [3]:

- a. penggunaan peralatan (termasuk alat perlindungan diri (APD))
- b. pemahaman terhadap sifat dan penggunaan bahan kimia
- c. pemahaman yang lengkap mengenai proses ekstraksi, agar dapat memberikan saran kepada pelanggan dan/atau menyarankan cara untuk menginterpretasikan hasil.
- d. pencegahan kontaminasi dan tindakan dekontaminasi

#### 4.3. Peralatan Laboratorium

Peralatan yang digunakan untuk kegiatan di setiap area kerja sebaiknya hanya digunakan di ruangan tersebut, termasuk jas laboratorium, sarung tangan, dan sandal laboratorium. Tidak ada bahan kerja, buku catatan, atau pena yang dibawa keluar atau masuk ruangan.

Sarung tangan yang digunakan sebaiknya bebas tepung (*powder-free*), dan pipet tip (*filtered tips*) menggunakan pipet yang terlindungi dari aerosol untuk perlindungan terhadap kontaminasi silang. Sarung tangan dan pipet tip harus diganti setiap perlakuan yang berbeda atau apabila terjadi keraguan bercampur dengan perekasi atau sampel lain [5]. Alat mikropipet dibersihkan dengan klorin 0,5%, dilanjutkan dengan etanol 70 % sebelum dan setelah digunakan.

Pemeliharaan peralatan harus mengikuti manual pabrik dan sistem kalibrasi peralatan yang sesuai harus tersedia. Peralatan utama yang perlu dipelihara yaitu [3]:

- a. peralatan yang digunakan untuk pencampuran sampel
- b. peralatan untuk proses ekstraksi DNA
- c. peralatan *pipetting*
- d. peralatan sterilisasi untuk alat dan bahan
- e. peralatan yang digunakan untuk penyimpanan sampel, hasil ekstraksi, atau larutan lainnya
- f. peralatan yang digunakan untuk amplifikasi DNA dan dokumentasinya
- g. peralatan untuk penimbangan sampel dan bahan

#### 4.4. Pereaksi

Pereaksi yang digunakan dalam ekstraksi DNA bertujuan untuk meminimalkan risiko kontaminasi [5] dan degradasi DNA [3]. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan dan penanganan pereaksi adalah sebagai berikut [5]:

- a. memiliki spesifikasi khusus untuk biologi molekuler;
- b. disimpan sesuai petunjuk penyimpanan dan tidak melebihi batas waktu penyimpanan;
- c. sebaiknya dipisahkan menjadi bagian kecil (alikuot) sebelum digunakan;
- d. air yang digunakan harus disuling dua kali, dideionisasi, atau air dengan kualitas yang setara;
- e. buffer harus dibuat dengan melarutkan reagen yang sesuai dan diautoklaf, kecuali ditentukan lain. Apabila tidak memungkinkan menggunakan autoklaf dapat menggunakan metode filtrasi steril (ukuran pori 0,22  $\mu\text{m}$ );
- f. pastikan tidak ada aktivitas enzim yang tidak diinginkan (contoh: eksonuklease) yang dapat mengganggu proses amplifikasi;
- g. buffer reaksi harus sesuai dengan enzim polimerase yang digunakan.

### 5. Prinsip Kerja

#### 5.1. Ketentuan Umum

##### 5.1.1. Pemilihan Metode

Pemilihan metode ekstraksi sangat berpengaruh terhadap keberhasilan pemurnian DNA. Oleh karena itu metode ekstraksi yang akan digunakan harus sesuai dengan tujuan ekstraksi dan jenis sampel, termasuk mempertimbangkan matriks sampel tersebut, misalnya untuk matriks yang berkaitan dengan hewan, aspek yang perlu dipertimbangkan adalah sebagai berikut [5]:

- a. sifat potensial dari matriks sampel
- b. tingkat pemrosesan konstituen sampel
- c. perbedaan spesies
- d. jenis jaringan hewan yang dianalisis
- e. persiapan konstituen sampel
- f. tingkat pemrosesan konstituen sampel

Beberapa metode ekstraksi di bawah ini dapat digunakan untuk matriks sampel yang lebih beragam namun kit ekstraksi yang tersedia secara komersial juga dapat digunakan sebagai alternatif [5]:

a. Metode CTAB

Metode ini dapat digunakan untuk ekstraksi DNA dari tanaman dan matriks turunan tanaman, khususnya karena kemampuannya untuk menghilangkan senyawa polisakarida dan polifenolik yang dapat mempengaruhi kualitas DNA. Namun, metode ini juga dapat digunakan untuk matriks lain [6].

b. Metode silika dasar

Metode ini dapat digunakan untuk ekstraksi DNA dengan cakupan matriks yang luas. Metode ini juga dapat diterapkan sebagai langkah purifikasi lebih lanjut dari larutan DNA yang terkandung setelah menggunakan metode ekstraksi DNA lain. Metode ini memiliki beberapa kelebihan jika digunakan untuk matriks yang sesuai, khususnya untuk menghindari penggunaan reagen yang sangat toksik. Selain itu, prosedur ini dapat dengan mudah diadaptasikan untuk analisis berkecepatan tinggi secara manual dan otomatis, khususnya karena perbedaan tegangan permukaan (seperti air-kloroform) dan karena sentrifugasi berkecepatan rendah diperlukan. Langkah purifikasi dengan metode ini dilakukan menggunakan resin silika, dengan adanya reagen chaotropik guanidin-hidroklorida. Prinsip dari metode ini adalah mengikat asam nukleat dengan silika di dalam kondisi *water activity* yang rendah karena efek entropis. Kontaminan dihilangkan dari resin menggunakan isopropanol, sedangkan DNA tetap terikat. Tahapan elusi akhir menggunakan buffer dengan kadar garam rendah memungkinkan untuk pemulihan DNA. Namun, metode ini tidak direkomendasikan untuk mengekstraksi DNA dari matriks kaya lemak [6].

Sifat korosif dan berbahaya dari fenol harus diperhatikan, sehingga penggunaan metode ekstraksi DNA berbasis CTAB (heksadesil-trimetil-amonium-bromida) dan/atau PVP (Polivinilpirolidon) dan/atau penyerapan silika lebih direkomendasikan [7].

### 5.1.2. Penyiapan Sampel

Pengambilan sampel uji harus dipastikan mewakili dari sampel laboratorium. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan homogenisasi atau proses lain yang sesuai. Sampel uji yang diambil untuk diekstraksi minimal sebanyak 2 (dua) unit dari sampel laboratorium yang telah dihomogenisasi. Sampel uji sebaiknya tidak diambil dari permukaan sampel laboratorium untuk meminimalkan risiko kontaminasi [5].

## 5.2. Peralatan dan Preaksi

### 5.2.1. Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah sebagai berikut, namun tidak terbatas pada [8]:

- a. alat sentrifugasi untuk *tube* 1,5 ml atau 2 ml, spesifikasi minimal  $12\,000 \times g$ .
- b. alat sentrifugasi untuk *tube* 50 ml, spesifikasi minimal  $4\,000 \times g$
- c. tabung sentrifugasi berbahan polipropilen, ukuran 1,5 ml, 2,0 ml, dan 50 ml
- d. *heating block* yang dilengkapi dengan perangkat *shaker*.
- e. pengering vakum (opsional), direkomendasikan untuk preparasi glass bead
- f. *multi mixer*, contohnya vortex.
- g. *real-time PCR thermal cycler*
- h. tabung reaksi dengan tutup atau penutup tambahan dengan syarat dapat dipanaskan berulang hingga suhu  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan didinginkan hingga suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tanpa adanya kerusakan dan tidak mempengaruhi sinyal fluoresensi yang dihasilkan selama proses amplifikasi.
- i. spektrofotometer UV atau fluorometer untuk menentukan konsentrasi DNA
- j. *glass bead* dengan ukuran diameter 0,2 - 0,5 mm yang sudah dikondisikan. *Glass bead* diinkubasi selama 12 jam dalam larutan konsentrat asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Bilas dengan air yang telah diautoklaf, dididihkan dalam larutan  $\text{KHCO}_3$ , bilas kembali dengan air yang sudah diautoklaf dan dikeringkan pada suhu  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dalam kondisi vakum.
- k. *cell disruptor*, untuk tube polietilen bertutup ukuran 2 ml, dengan frekuensi minimal 100 beat/menit (contohnya Mini-BeadBeater<sup>TM 4</sup>).
- l. lemari asam, untuk penanganan bahan kimia volatil berbahaya

### 5.2.2. Perekasi

Perekasi yang diperlukan dalam proses ekstraksi DNA adalah sebagai berikut, namun tidak terbatas pada [7][8]:

- a. etanol ( $C_2H_5OH$ ) 96 % dan 70 %.
- b. kloroform ( $CHCl_3$ ).
- c. isopropanol [ $CH_3CH(OH)CH_3$ ].
- d. tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) ( $C_4H_{11}NO_3$ ).
- e. dipotasium etilendiamintetraasetat ( $K_2EDTA$ ) ( $C_{10}H_{14}N_2O_8K_2$ ).
- f. sodium dodesil sulfat (SDS) ( $C_{12}H_{25}O_4SNa$ ).
- g. disodium etilendiamintetraasetat ( $Na_2-EDTA$ ) ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$ ).
- h. larutan Proteinase-K,  $\rho = 20$  mg/ml, dilarutkan dalam air steril. Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu  $-20$  °C atau sesuai dengan petunjuk produk, hindari pembekuan dan pencairan berulang.
- i. RNase-A, DNase-free, dari pankreas sapi, sekitar 50 Kunitz Units/mg liofilisat.
- j. heksadesil-trimetil-amonium-bromida (CTAB) ( $C_{19}H_{42}BrN$ ).
- k. asam klorida (HCl) 37 %.
- l. sodium klorida (NaCl).
- m. buffer ekstraksi CTAB,  $\rho(CTAB) = 20$  g/l,  $c(NaCl) = 1,4$  mol/l,  $c(Tris) = 0,1$  mol/l,  $c(Na_2EDTA) = 0,02$  mol/l. Atur pH hingga 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.
- n. sodium hidroksida (NaOH).
- o. buffer ekstraksi/lisis,  $c(Tris) = 0,050$  mol/l,  $c(K_2EDTA) = 0,050$  mol/l,  $\rho(SDS) = 30$  g/l. Atur pH hingga 8,0 menggunakan HCl atau KOH.
- p. buffer TE,  $c(Tris) = 0,010$  mol/l,  $c(K_2EDTA) = 0,001$  mol/l. Atur pH hingga 8,0 menggunakan HCl atau KOH.
- q. larutan lisozim khusus untuk dinding bakteri, 10 mg/ml, dilarutkan dalam air steril. Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu  $-20$  °C, hindari pembekuan dan pencairan berulang.
- r. larutan mutanolisin untuk menghancurkan dinding sel bakteri laktobasilus daging, 500 U/ml atau 5 000 U/ml, dilarutkan dalam air steril. Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu  $-20$  °C, hindari pembekuan dan pencairan berulang.

- s. kloroform-isoamil alkohol. Disiapkan dengan mencampurkan kloroform dengan isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1
- t. fenol-kloroform-isoamil alkohol. Disiapkan dengan mencampurkan 25 bagian fenol dengan 24 bagian kloroform dan 1 bagian isoamil alkohol.
- u. guanidin hidroklorida ( $\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}$ ).
- v. silika ( $\text{SiO}_2$ ), silikon dioksida dengan ukuran partikel 0,5 - 10  $\mu\text{m}$  (80 % 1 - 5  $\mu\text{m}$ ).

### 5.3. Ekstraksi/Purifikasi DNA

Proses ekstraksi bertujuan untuk memperoleh DNA yang berkualitas dan digunakan untuk analisis selanjutnya. Kualitas DNA yang dimaksud bergantung pada panjang rata-rata dari molekul DNA yang terekstraksi, kemurnian DNA, dan integritas struktur dari urutan DNA. Proses ekstraksi DNA merupakan peristiwa terlepasnya DNA dari dalam matriks sampel dan pemurnian DNA dari inhibitor pada proses amplifikasi DNA. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas DNA, di antaranya yaitu variabel lingkungan seperti kelembaban dan perlakuan selama ekstraksi.

Prinsip ekstraksi yang perlu diperhatikan antara lain:

- a. Metode ekstraksi yang digunakan perlu disesuaikan dengan matriks sampel untuk memperoleh hasil ekstraksi yang berkualitas [3]
- b. DNA yang terekstraksi sebaiknya disimpan pada kondisi yang stabilitasnya terjamin untuk dilakukan analisis selanjutnya [3]
- c. Hindari pembekuan dan pencairan berulang terhadap larutan DNA [3]
- d. Jumlah dan volume buffer yang digunakan disesuaikan dengan jumlah porsi uji yang digunakan [3]
- e. Bahan acuan/kontrol harus digunakan dan diproses dengan cara yang sama seperti sampel uji [3]
- f. Apabila bahan acuan/kontrol merupakan DNA *template*, diproses setelah tahap ekstraksi [3]
- g. DNA yang diekstraksi dari masing-masing sampel uji harus dianalisis minimal secara duplo [6].
- h. Tahap lisis merupakan tahapan kritis dalam proses ekstraksi. Proses ini dapat menggunakan sodium dodesil sulfat dan EDTA konsentrasi tinggi [6].



- i. Sel mikroba pada sampel dapat diproses dengan menstimulasi pertumbuhan dari mikroorganisme target menggunakan media selektif atau non-selektif [2].
- j. Tahap menghilangkan kontaminan [7]:
  - polisakarida (pektin, selulosa, hemiselulosa, pati, pengental, atau polisakarida lainnya) menggunakan perlakuan enzim yang sesuai (contohnya pektinase, selulase, hemiselulase) atau larutan lain (contohnya CTAB/kloroform);
  - RNA dan/atau protein menggunakan perlakuan yang sesuai, seperti perlakuan enzimatis menggunakan RNase untuk RNA dan proteinase untuk protein;
  - fraksi lemak menggunakan perlakuan enzim atau pelarut, misalnya n-heksana;
  - garam (misalnya dari buffer ekstraksi/lisis, atau dari tahapan penguapan), yang dapat mempengaruhi analisis pada tahap selanjutnya.

#### 5.4. Kontrol

Kontrol pada proses ekstraksi harus tersedia. Laboratorium minimum menyediakan kontrol blanko ekstraksi dan kontrol positif ekstraksi. Namun laboratorium juga dapat menyediakan kontrol lingkungan [8].

##### a. Kontrol lingkungan

Kontrol ini dapat digunakan untuk melakukan identifikasi sumber kontaminasi pada tahapan awal ekstraksi, yang dapat dimulai dari homogenisasi sampel, misalnya apabila sampel negatif diikuti dalam homogenisasi, maka hasilnya menunjukkan hasil negatif.

##### b. Kontrol blanko ekstraksi atau kontrol negatif ekstraksi

Laboratorium harus menyediakan minimum 1 (satu) kontrol blanko ekstraksi pada saat melakukan ekstraksi. Kontrol negatif ini digunakan untuk memantau apakah ada kemungkinan kontaminasi sampel terjadi selama tahap ekstraksi. Untuk kontrol ini, harus menggunakan reagen/komponen yang bebas dari DNA target, misalnya menggunakan air murni (*ultrapure water*, BPW atau garam pepton. Kontrol negatif juga dapat menggunakan matriks yang sama dengan yang sedang diujikan, namun harus dipastikan tidak terdapat DNA target.

Kontrol blanko ini harus selalu ditempatkan pada posisi terakhir di setiap seri ekstraksi. Laboratorium juga direkomendasikan untuk meletakkan satu blanko ekstraksi pada rak ekstraksi atau pada alat ekstraksi.

c. Kontrol positif ekstraksi

Kontrol positif ekstraksi harus disediakan secara reguler. Kontrol ini dapat menunjukkan apabila terjadi kesalahan pada pereaksi atau kinerja protokol/metode ekstraksi.

## 5.5. Kuantifikasi Total DNA dan Kemurnian DNA

Proses kuantifikasi total DNA dan pemeriksaan kemurnian DNA dilakukan setelah ekstraksi sampel. Sampel DNA yang akan dianalisis menggunakan qPCR atau dPCR harus diperiksa integritas dan kemurniannya untuk memastikan sampel DNA tidak terdegradasi dan tidak mengandung kontaminan (inhibitor, RNA, dan senyawa lainnya). Konsentrasi massa DNA, yang dinyatakan dalam ng/ $\mu$ l atau  $\mu$ g/ml, sebaiknya diukur untuk memastikan konsistensi sampel yang akan dianalisis menggunakan qPCR atau dPCR, karena kinerja metode tersebut dapat dipengaruhi oleh jumlah DNA dalam matriks.

Selain pemeriksaan terhadap kemurnian, DNA perlu dikuantifikasi untuk memastikan DNA yang terkandung cukup untuk dilakukan analisis selanjutnya.

Homogenitas dari sampel DNA merupakan faktor kritis dalam setiap metode kuantifikasi DNA. Sampel DNA harus dilarutkan dan diaduk secara sempurna sebelum dikuantifikasi.

Kuantifikasi total DNA dan pemeriksaan kemurnian DNA dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan antara lain [1]:

### 5.5.1. Spektrofotometri UV

Konsentrasi dan kemurnian DNA dapat diukur menggunakan spektrofotometer UV. Spektrofotometer yang digunakan harus dikalibrasi menggunakan bahan acuan bersertifikat dengan komposisi yang cukup mirip dengan sampel uji agar hasil pengukuran tertelusur ke Sistem Satuan Internasional (SI). Hal ini dilakukan agar tidak terjadi bias yang disebabkan oleh adanya:

- Semua jenis asam nukleat yang mempengaruhi pembacaan absorbansi, seperti DNA, RNA, oligonukleotida pendek, dan nukleotida bebas,
- Senyawa kimia yang memiliki serapan pada atau mendekati panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 nm seperti senyawa fenolik yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA.

Konsentrasi DNA bergantung pada jenis DNA yang dikuantifikasi (DNA untai ganda (ds) dan untai tunggal (ss)) dan diukur menggunakan spektrofotometer

UV pada  $\lambda = 260$  nm. Nilai absorbansi 1,0 pada  $\lambda = 260$  nm setara dengan  $\sim 50$   $\mu\text{g/ml}$  (ds) DNA murni.

Kemurnian DNA diukur menggunakan rasio pembacaan absorbansi pada  $\lambda = 260$  terhadap absorbansi pada  $\lambda = 280$  nm (rasio 260/280). DNA yang murni menunjukkan nilai rasio 260/280 yang mendekati 1,8. Nilai rasio mendekati 2 mengindikasikan adanya kontaminasi RNA sedangkan nilai rasio kurang dari 1,8, menunjukkan adanya kontaminasi protein, fenol, atau kontaminan lainnya [1].

### 5.5.2. Fluorometri

Metode fluoresensi bergantung pada karakteristik fluoresensi dari molekul kecil atau *dye* yang mengikat pada asam nukleat. Perlu dipertimbangkan adanya potensi sumber bias yang mempengaruhi metode fluorometri, antara lain [1]:

- a. denaturasi asam nukleat ;
- b. degradasi asam nukleat karena beberapa *dye* lebih mudah terikat pada molekul dengan ukuran tertentu;
- c. suhu;
- d. pH;
- e. paparan UV (*photobleaching*);
- f. kontaminasi kimiawi yang dapat mempengaruhi efisiensi pengikatan (informasi dari penyedia perlu diperhatikan);
- g. kontaminasi kimiawi yang dapat menyebabkan *fluorescence quenching* karena hal ini dapat mempengaruhi pembacaan fluorometri secara signifikan (misalnya ion berat seperti iodida).

Penggunaan pewarna fluoresens untuk kuantifikasi asam nukleat total merupakan metode lain yang bergantung pada karakteristik fluoresens molekul kecil atau pewarna yang berikatan dengan asam nukleat [1].

### 5.5.3. qPCR/dPCR

Kinerja uji kuantifikasi asam nukleat dengan metode ini harus dilakukan optimasi, antara lain untuk parameter *output* sinyal, efisiensi PCR, dan spesifitas. Setelah parameter uji dasar dioptimalkan, efisiensi PCR dari prosedur pengukuran berbasis qPCR harus ditentukan.

Efisiensi PCR dari uji qPCR biasanya diuji dengan membuat kurva standar dari seri pengenceran. Bahan kalibrasi atau sampel yang digunakan sebagai larutan standar harus terdiri dari DNA *template* yang dimurnikan. DNA ini berupa oligonukleotida sintesis, plasmid yang dimurnikan, gDNA yang dimurnikan, atau produk PCR yang dimurnikan. Larutan standar juga dapat diproduksi dari stok berkonsentrasi tinggi yang diencerkan secara serial [1].

Kurva standar harus mencakup rentang konsentrasi seluas mungkin dan dapat diterapkan pada penggunaan prosedur pengukuran yang ditetapkan. Batas yang dapat diterima untuk *slope* kurva kalibrasi harus ditentukan berdasarkan interval kepercayaan yang ditentukan untuk efisiensi PCR selama pengoptimalan pengujian. Efisiensi PCR rata-rata harus berkisar 90 - 110 % ( $-3,6 < slope < -3,1$ ). Derajat linearitas harus dihitung dalam bentuk koefisien korelasi (misalnya koefisien korelasi Pearson, R). Koefisien korelasi  $R^2$  harus lebih besar dari 0,99. Efisiensi PCR yang baik ditunjukkan dengan rentang kepercayaan yang sempit [1].

Apabila terdapat satu *outlier* yang terdeteksi, data dan hasil analisis harus ditinjau untuk mengidentifikasi penyebab *outlier* tersebut. Apabila penyebabnya dapat diidentifikasi dan dapat dikecualikan, *outlier* dapat dihapus dari analisis dan data yang tersisa dan dapat digunakan untuk membuat kurva standar. Jika lebih dari satu *outlier* terdeteksi untuk sampel, data yang sesuai dengan sampel ini tidak boleh digunakan untuk membuat kurva standar. Dalam membuat kurva standar, data qPCR dari larutan standar dihitung dengan persamaan regresi linear berikut [1]:

$$y = a + bx \quad (1)$$

dengan

$y$  adalah nilai siklus kuantifikasi (Cq)

$a$  adalah *intercept*

$b$  adalah gradien/*slope*

$x$  adalah log berbasis 10 konsentrasi ( $\log_{10}(c_i)$ ) atau konsentrasi relatif (dalam kasus seri pengenceran) dari larutan standar

## 5.6. Integritas DNA

Integritas DNA dapat mempengaruhi kuantifikasi yang akurat dari sekuen target spesifik sehingga informasi terkait integritas sampel harus tersedia. Metode yang sering digunakan dalam menentukan integritas DNA adalah dengan menggunakan elektroforesis gel (kapiler dan *slab*) dan pengukuran panjang amplicon. Dalam penentuan integritas DNA ini, perlu memperhatikan kontrol positif dan bahan kalibrasi yang akan digunakan untuk kuantifikasi atau menilai secara kualitatif integritas asam nukleat pada sampel uji. Penentuan integritas DNA ini memungkinkan penilaian terhadap faktor yang mempengaruhi kinerja prosedur pengukuran berbasis qPCR atau dPCR, seperti adanya degradasi DNA (fragmen pendek) atau DNA bermassa molekul tinggi [1].

Untuk gDNA seluler, pita bermassa molekul tinggi biasanya terdapat pada bagian atas gel. Pita yang membentuk *smear* atau ekor komet mengindikasikan degradasi dan fragmentasi sampel. Sebaliknya, untuk DNA yang bebas sel, ukuran fragmen paling bawah yang diharapkan mendekati 130 - 170 pasangan basa (bp) [1].

## 5.7. Penyimpanan dan Penanganan DNA Pasca-Ekstraksi

Penyimpanan dan penanganan DNA pasca ekstraksi yang tepat sangat penting untuk pemeliharaan DNA. Strategi penyimpanan DNA akan bergantung pada jenis DNA, suhu penyimpanan, tujuan penggunaan sampel, dan lamanya waktu penyimpanan DNA [9].

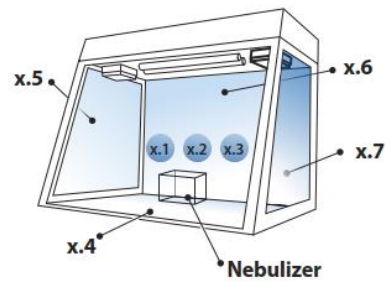
Berdasarkan penelitian Podivinsky *et al.* [10] terkait kondisi penyimpanan DNA, dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

- a. Sampel DNA dapat berada dalam kondisi stabil pada suhu 4 °C dalam bentuk larutan dan dalam bentuk liofilisat pada suhu -20 °C
- b. Suhu -20 °C sangat direkomendasikan digunakan sebagai suhu penyimpanan jangka pendek
- c. Suhu -80 °C sangat direkomendasikan digunakan sebagai suhu penyimpanan jangka panjang

## 5.8. Pemantauan Kontaminasi DNA

Pencegahan dan pengendalian kontaminasi DNA di laboratorium PCR sangat penting untuk integritas eksperimen dan peralatan, yang dapat memengaruhi keakuratan hasil uji PCR. Uji kontaminasi DNA dilakukan pada kabinet dengan uv dan meja kerja

dengan pengambilan sampel udara dan usapan/*swab* (kapas steril) pada permukaan area kerja yang dilakukan secara berkala setiap 3 atau 6 bulan sesuai dengan kondisi laboratorium dan sampel yang diuji (lihat [Gambar 3](#)). Usapan/*swab* kemudian dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus yang telah berisi 500  $\mu$ l air steril dan dihomogenkan, selanjutnya dilakukan PCR untuk mendeteksi adanya kontaminan [11].



**Samples taken from:**

- x.1, x.2, x.3 : Air (Syringes)
- x.4 : Working surface (Swab)
- x.5, x.7 : Side walls (Swabs)
- x.6 : Back wall (Swab)

Gambar 3. Cara pengambilan sampel udara dan *swab* permukaan [11]

## Daftar Pustaka

- [1] SNI ISO 20395. (2019). Bioteknologi – Persyaratan untuk evaluasi kinerja metode kuantifikasi untuk sekuens target asam nukleat – qPCR dan dPCR
- [2] ISO 22174. (2024). *Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms – General requirement and definitions*
- [3] ISO 13495. (2013). *Foodstuffs – Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid*
- [4] ISO 24276. (2006). *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions*
- [5] SNI ISO 20813. (2019). Analisis biomarker molekuler — Metode analisis untuk deteksi dan identifikasi spesies hewan pada pangan dan produk pangan (metode berbasis asam nukleat) — Persyaratan umum dan definisi
- [6] ISO 21570. (2005). *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods*
- [7] ISO 21571. (2005). *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction*
- [8] ISO 21571. (2005). *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction. Amended in 2013*
- [9] How to Store DNA. (2023). Diakses pada tanggal 9 Desember 2024 dari <https://www.news-medical.net/life-sciences>
- [10] Podivinsky, E., Love, J.L., van der Colff, L., & Samuel, L. (2009). Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 394(1), 132–134
- [11] Tarvida, M., Isakova, J., Bankovsky, V., Kigitovics, A., & Gimelfarb, V. (2018). Development and evaluation of DNA amplicon quantification. Case study: UV–Cabinet with UV Air Recirculator UVC/T-M-AR and Class II Biological Safety Cabinets. *Application and Articles*. 147–154



**Diterbitkan oleh :**

**LABORATORIUM STANDAR NASIONAL SATUAN UKURAN BSN**

KST BJ Habibie, Gedung 1101, Setu,  
Tangerang Selatan, Banten, Indonesia - 15314

Telp. 021-7560533, 7560534, 7560571

Fax. 021-7560568, 7560064

[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)