

KUANTIFIKASI HASIL EKSTRAKSI GEN SEBAGAI FAKTOR KRITIS UNTUK KEBERHASILAN PEMERIKSAAN RT-PCR

Eka Pratiwi¹, Lovendo Ilham Widodo²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan,
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Indonesia
² Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

ABSTRAK

Riwayat Artikel:

Submit: 7/1/2020
Diterima: 19/2/2020
Diterbitkan: 12/3/2020

Kata Kunci:

Ekstraksi,
Virus,
Pernafasan

Abstract:

Viral and bacterial infections are the most common cause of respiratory tract infections in developing countries. Influenza Like Illness (ILI) is a complex and heterogeneous group of diseases caused by various etiology. ILI etiology consists of approximately 300 types of viruses, bacteria, rickettsiae and fungi. Detection of the cause of the current ILI case suffered some difficulties namely in determining the ILI etiology of the specimen. First step of the Polymerase Chain Reaction (PCR) is separating nucleic acids from other cell components, acquired nucleic acids can be analyzed by other molecular biology techniques. After extraction, a quantifying involves measuring the concentration of nucleic acids using the Fluorometric Qubit tool obtained some of RNA samples < 20 ng/mL so that it cannot be measured by this tool and the results of DNA measurements vary with the range 4.99 – 99,2 ng/mL. The Nanovue Plus also used for the measurement of nucleic acid concentrations and purity, for the RNA value obtained range 0.0564 – 0, 1396ng/mL and the concentration of DNA is 0.0875 – 0.1365 ng/mL. Measurement of purity using Nanovue Plus not obtained pure DNA with a value > 1.80 and RNA measurement obtained some samples that have purity with a value > 2.00.

Abstrak:

Infeksi virus dan bakteri menjadi penyebab terbanyak infeksi saluran pernafasan di negara berkembang. *Influenza Like Illness* (ILI) merupakan kelompok penyakit yang kompleks dan heterogen yang disebabkan oleh berbagai etiologi. Etiologi ILI terdiri dari kurang lebih 300 jenis virus, bakteri, riketsia dan jamur. Deteksi penyebab kasus ILI saat ini mengalami beberapa kesulitan yaitu dalam menentukan etiologi ILI dari spesimen. Tahap awal dari metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dimulai dengan melakukan ekstraksi, yaitu memisahkan asam nukleat dari komponen sel lainnya, sehingga asam nukleat yang diperoleh dapat dianalisis atau dimodifikasi lebih lanjut dengan teknik biologi molekular lainnya. Setelah ekstraksi, dilakukan kuantifikasi meliputi pengukuran konsentrasi asam nukleat menggunakan alat Qubit fluorometric didapatkan beberapa sampel RNA nya < 20 ng/mL sehingga tidak dapat terukur alat ini dan hasil pengukuran DNA nya bervariasi dengan range 4,99 – 99,2 ng/mL. Alat Nanovue Plus juga digunakan untuk pengukuran konsentrasi asam nukleat dan kemurnian, untuk nilai RNA didapatkan range 0,0564 – 0,1396ng/mL lalu konsentrasi DNA berada di kisaran 0,0875 – 0,1365 ng/mL. Pada pengukuran kemurnian menggunakan Nanovue Plus tidak didapatkan DNA yang murni dengan nilai >1,80 dan pengukuran RNA didapat beberapa sampel yang mempunyai kemurnian dengan nilai >2,00.



Penulis Korespondensi:

Eka Pratiwi,
Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan,
Kementerian Kesehatan, Indonesia.
Email: tiwie248@yahoo.com

Cara Mengutip:

E. Pratiwi and L. I. Widodo, “Kuantifikasi Hasil Ekstraksi Gen sebagai Faktor Kritis untuk Keberhasilan Pemeriksaan RT PCR”, *Indones. J. Heal. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 1-9, 2020.

PENDAHULUAN

Infeksi saluran pernafasan merupakan penyakit menular yang menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia. Infeksi saluran nafas meliputi beberapa penyakit infeksi saluran nafas atas dan infeksi saluran nafas bawah. Infeksi saluran nafas atas meliputi *rhinitis*, *sinusitis*, *faringitis*, *laryngitis*, *epiglottitis*, *tonsillitis* dan *otitis*. Sedangkan infeksi saluran nafas bawah meliputi infeksi pada bronchus, alveoli seperti *bronchitis*, *bronchiolitis* dan *pneumonia*. Infeksi saluran nafas atas bila tidak diatasi dengan baik dapat berkembang menyebabkan infeksi saluran nafas bawah. Kejadian infeksi saluran nafas atas paling banyak terjadi, sehingga diperlukan penanganan dengan baik karena dampak komplikasinya dapat membahayakan [1].

Menurut WHO tahun 2007 [2], penyakit Infeksi Saluran Pernafasan Akut (ISPA) termasuk ke dalam golongan *air borne disease* yang sangat menular. Mudahnya penularan ISPA timbul karena menurunnya sistem kekebalan tubuh penderita. Secara umum gejala klinis utama penderita ISPA meliputi demam, batuk, pilek, sesak nafas, nyeri tenggorok, dan mengi atau kesulitan bernafas. Bila tidak terdapat komplikasi, gejala akan berkurang sesudah 3-5 hari. Komplikasi yang mungkin terjadi adalah *sinusitis*, *faringitis*, *otitis media*, infeksi saluran *tuba eustachii*, hingga *bronchitis* dan *pneumonia*. Secara umum penyebab dari infeksi saluran nafas adalah berbagai mikroorganisme. Namun penyebab terbanyak di negara berkembang yakni akibat infeksi virus dan bakteri. Infeksi saluran nafas dapat terjadi sepanjang tahun, meskipun beberapa infeksi lebih mudah terjadi pada musim hujan [3].

Influenza Like Illness (ILI) adalah suatu infeksi saluran pernafasan akut dengan demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ dan batuk dengan tanggal mulainya gejala (demam atau batuk) tidak lebih dari 10 hari [4]. ILI merupakan kelompok penyakit yang kompleks dan heterogen yang disebabkan oleh berbagai etiologi. Etiologi ILI terdiri

dari kurang lebih 300 jenis virus, bakteri, riketsia dan jamur. Bakteri penyebab ILI diantaranya adalah *Streptococcus pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pneumococcus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus friedlander*, *Haemophilus influenzae*, *Moxarella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, dan *Legionella pneumophila*. Sedangkan virus penyebab ISPA antara lain *Respiratory Syncytial Virus*, *Influenza virus*, *Coronavirus*, *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Parainfluenza virus*, *Rhinovirus*, *Human Metapneumovirus*, *Parechovirus* dan *Bocavirus* [5]. Jamur penginfeksi saluran nafas seperti *Mycoplasma pneumoces dermatitides*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus*, dan *Candida albicans*. Menurut data beberapa penelitian yang ada ternyata sekitar 90-95% penyakit ILI disebabkan oleh virus [6].

Dewasa ini, pengetahuan mengenai patogen penyebab ILI di Indonesia masih terbatas. Disamping itu, kasus ILI sering dikaitkan dengan sulitnya menentukan manifestasi klinis yang spesifik dari penderita, karena secara umum penderita infeksi saluran nafas mengalami gejala yang mirip walaupun disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang berbeda [7].

Penelitian mengenai diagnosis etiologis ILI yang berbasis laboratorium masih sangat jarang sehingga perlu dilakukan untuk dapat segera mendeteksi patogen penyebab dari kasus ILI yang beredar di beberapa daerah di Indonesia

Deteksi penyebab kasus ILI saat ini mengalami beberapa kesulitan yaitu dalam menentukan etiologi ILI dari spesimen lapangan. Pengambilan spesimen di lapangan hanya mungkin dengan cara usap hidung atau tenggorok. Padahal diketahui bahwa banyak bakteri komensal di tenggorokan, sehingga sulit untuk menentukan mana yang berperan sebagai mikroorganisme patogen. Sebaliknya spesimen usap tenggorok yang positif terhadap virus sudah cukup baik untuk

membuktikan etiologi ILI, karena virus tidak hidup komensal di tenggorokan. Banyak ragam jenis dari virus saluran pernafasan menjadi permasalahan yang dihadapi sampai sekarang, namun pemeriksaan konvensional seperti kultur virus dan uji serologi masih belum spesifik. Tujuan dari studi ini untuk mengevaluasi dua alat pengukur yaitu *Qubit Fluorometer* dan *Nanovue Plus* dalam mengukur konsentrasi dan kemurnian suatu asam nukleat yang nantinya akan berperan penting terhadap pemeriksaan selanjutnya menggunakan RT-PCR

METODE PENELITIAN

Spesimen

Sampel pada penelitian ini adalah swab hidung dan swab tenggorokkan yang sebelumnya sudah dilakukan pemeriksaan influenza dengan hasil negatif dari suspek ILI yang diambil di sentinel surveilans ILI yaitu beberapa puskesmas di Indonesia tahun 2016. Spesimen yang diuji kuantifikasi hasil ekstraksinya sebanyak 4 swab hidung dan tenggorok dengan volume minimal 1 mL.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, *Laminar air flow*, BSC II (*Class II Biosafety Cabinet*), *Qubit Fluorometer*, *Nanovue Plus*, *sentrifuge*, *vortex*, *spin dow*, tabung *ependorf* 0,5 ml & 1,5 ml, *spin column*, *collection tube*, mikropipet dan *aerosol barrier tips* (1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l). Bahan-bahan yang digunakan kit ekstraksi *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, alkohol absolut, *Seegene Anyplex™II RV16 Detection*, *Qubit™ RNA reagent*, *Qubit™ HS RNA buffer*, *Qubit™ dsDNA reagent*, dan *Qubit™ HS dsDNA buffer*.

Ekstraksi RNA Virus

Pembuatan *Lysis Buffer* berasal dari gabungan kit ekstraksi *QIAamp® Viral RNA* dan *Seegene Anyplex™II RV16 Detection*, yang terdiri dari 0,56 mL *Buffer AVL*, 5,6 μ l *RNA Carrier*, dan 10 μ l *Internal Control* dimasukkan ke dalam

tabung sentrifugasi 1,5ml, lalu ditambahkan dengan 140 μ l sampel, divorteks, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian *dispin down*. Sebanyak 560 μ l alkohol *absolute* ditambahkan ke dalam *lysate*, divorteks sesaat, kemudian *dispin down*. *Lysate* sebanyak 630 μ l dipindahkan ke *spin column* bersama *collection tube*, lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit (dilakukan 2 kali).

Collection tube dilepaskan, lalu *spin column* dipasang ke *collection tube* baru, dan ditambahkan *buffer AW1*, kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* dilepaskan, lalu *spin column* dipasang ke *collection tube* baru, dan ditambahkan *buffer AW2*, kemudian disentrifugasi pada 14000 rpm selama 3 menit. *Collection tube* dilepaskan, lalu *spin column* dipasang ke *collection tube* baru, kemudian disentrifugasi pada 14000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* dilepaskan, lalu *spin column* dipasang ke tabung *ependorf* 1,5 ml, kemudian ditambahkan 60 μ l *buffer AVE*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. *Spin column* dibuang dan diberi label pada *tube* [8].

IC harus ditambahkan bersamaan dengan *Buffer AVL* dan *RNA carrier*. Internal Control (IC) merupakan faktor yang sangat penting sebagai kontrol dari kualitas pengujian sehingga dipastikan pengujian dilakukan secara benar, terutama dalam tahapan ekstraksi. Penerapan IC telah dikembangkan untuk menguji sampel klinik. Penambahan IC ada kaitannya dengan pemeriksaan selanjutnya yaitu pemeriksaan menggunakan *multiplex PCR* yang menggunakan berbagai macam jenis primer untuk banyak virus spesifik. IC dapat berupa rancangan tiruan yang digunakan untuk mengikat bagian primer yang sama dengan sekuen internal sehingga dapat dibedakan dari sekuen target baik ukuran maupun *probe*-nya atau dapat pula berupa sekuen target yang berbeda dan memiliki primer atau *probe* yang berbeda

sehingga tidak digunakan untuk meng-amplifikasi target amplicon [9].

Pengukuran Konsentrasi Asam Nukelat

Pengukuran konsentrasi dengan alat Qubit fluorometer menggunakan reagen yang berbeda tiap pemeriksaan, baik itu DNA maupun RNA mempunyai beberapa reagen terpisah yang harus dicampurkan terlebih dulu untuk kemudian ditambahkan spesimen. Larutan *working solution* dan sampel RNA dicampurkan hingga total volume 200 µL (volume sampel RNA 1-20 µL, *working solution* 180-199 µL). Campuran tersebut divortex selama 2-3 detik agar tidak terbentuk gelembung. Campuran diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Kemudian dibaca menggunakan Qubit yang sudah dinyalakan ke program yang sesuai dengan reagen yang digunakan [10]. Pengukuran konsentrasi asam nukleat juga dilakukan dengan alat Nanovue Plus, dengan memilih menu yang sudah tersedia bisa DNA juga RNA. Bila menggunakan alat ini tidak memerlukan reagen dan volume yang dibutuhkan hanya 1µL.

Pengukuran Kemurnian Asam Nukelat

Pengukuran tingkat kemurnian asam nukleat dari hasil ekstraksi pada percobaan ini menggunakan Pembacaan hasil akan terlihat rasio dari nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm dan 260/230 nm dilihat pada layar untuk melihat tingkat purifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Pengukuran Konsentrasi Asam Nukleat

Hasil pengukuran konsentrasi asam nukleat meliputi konsentrasi RNA dan konsentrasi DNA. Pengukuran pertama menggunakan alat Qubit fluorometric. Terlihat di tabel 1 bahwa konsentrasi RNA hampir semuanya mempunyai nilai <20 ng/mL, sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah <20 ng/mL,

<20 ng/mL, <20 ng/mL, dan 21 ng/mL. Adapun nilai konsentrasi DNA yang diukur dengan Qubit® fluorometer pada sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah 4,99 ng/mL, 99,2 ng/mL, 35,4 ng/mL, dan 13,1 ng/mL

Tabel 1.
Hasil Pengukuran Konsentrasi Asam Nukleat dengan Qubit® fluorometric

Nomor Sampel	Konsentrasi (ng/mL)	
	RNA	DNA
MP16 738 ILI	< 20	4,99
MP16 743 ILI	< 20	99,2
MP16 751 ILI	< 20	35,4
MP16 987 ILI	21	13,1

Berbeda dengan alat sebelumnya, Nanovue plus ini mempunyai prinsip spektrofotometer yaitu absorbansi UV. Pada tabel 2 dibawah ini nilai konsentrasi RNA yang diukur dengan Nanovue Plus pada sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah 0,0248 ng/mL, 0,0928 ng/mL, 0,0564 ng/mL, dan 0,1396 ng/mL. Adapun nilai konsentrasi DNA yang diukur dengan Nanovue Plus pada sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah 0,0875 ng/mL, 0,1365 ng/mL, 0,1340 ng/mL, dan 0,0875 ng/mL.

Tabel 2.
Hasil Pengukuran Konsentrasi Asam Nukleat dengan Nanovue Plus

Nomor Sampel	Konsentrasi (ng/mL)	
	RNA	DNA
MP16 738 ILI	0,0248	0,0875
MP16 743 ILI	0,0920	0,1365
MP16 751 ILI	0,0564	0,1340
MP16 987 ILI	0,1396	0,0875

Pengukuran Kemurnian Asam Nukleat

Nilai kemurnian RNA yang diukur dengan Nanovue Plus terlihat di tabel.3 pada sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah 2,573; 1,620; 2,238 dan 1,436. Adapun nilai kemurnian DNA yang diukur dengan Nanovue Plus pada sampel nomor MP16 738 ILI, MP16 743 ILI, MP16 751 ILI, dan MP16 987 ILI berturut-turut adalah 1,190; 1,460; 1,586 dan 1,620.

Tabel 3.
Hasil Pengukuran Tingkat Kemurnian Asam Nukleat Hasil Ekstraksi dengan Nanovue Plus

Nomor Sampel	Absorbansi A260/A280	
	RNA	DNA
MP16 738 ILI	2,573	1,190
MP16 743 ILI	1,620	1,460
MP16 751 ILI	2,238	1,586
MP16 987 ILI	1,436	1,620

PEMBAHASAN

Untuk mendapatkan suatu hasil diagnostik yang cepat, tepat, dan akurat, diperlukan jenis spesimen sebagai sumber RNA virus yang tepat dan mempunyai probabilitas tinggi pula. Untuk mendeteksi virus respiratori, jenis spesimen yang bisa digunakan adalah swab tenggorok dan nasal, bilasan nasofaring, aspirat sputum, cairan pleura, bilasan trakeal, dan bilasan bronkoalveolus. Namun pada penggunaan praktis yang sering digunakan adalah swab tenggorok dan swab hidung [11] yang negatif pada pemeriksaan swab tenggorok namun dinyatakan positif pada pemeriksaan swab hidung kemungkinan disebabkan karena pada spesimen usapan maupun bilasan tenggorok biasanya mengandung konsentrasi virus yang lebih sedikit dari pada sampel dari hidung. Teknik pengambilan sampel juga sangat mempengaruhi hasil pemeriksaan. Hasil yang negatif salah satunya bisa disebabkan oleh teknik pengambilan sampel yang salah maupun

karena pasien tidak kooperatif, terutama pada pasien anak-anak [12]. Spesimen dari swab yang valid adalah spesimen yang pada pemeriksaan RT-PCR didapatkan RWP *gene* dan B-*active gene*, artinya swab tersebut harus disertai dengan epitel dimana swab tersebut diambil. Alat swab yang benar menggunakan bahan dakron, dan tidak diperbolehkan menggunakan bahan-bahan organik seperti kapas atau kayu, karena dapat mempengaruhi hasil PCR.

Konsentrasi RNA sampel dapat mempengaruhi hasil RT-PCR, konsentrasi yang didapat dari hasil ekstraksi akan berkaitan dengan pemeriksaan berikutnya, misalnya metode PCR yang membutuhkan minimal konsentrasi dikarenakan menggunakan enzim tertentu yang mensyaratkan RNA atau DNA dalam hasil ekstraksi mencukupi. Mengukur konsentrasi RNA dengan rasio A260/A280 dengan kemurnian 1,8 maka hanya 40% RNA dan sisanya protein. Konsentrasi RNA diukur dengan panjang gelombang 260. Nilai absorbansi merupakan nilai yang diukur menggunakan panjang gelombang 260, sehingga nilai absorbansi merupakan acuan banyaknya konsentrasi RNA pada suatu sampel. RNA dapat menyerap sinar ultraviolet pada panjang gelombang 260. Di dalam spektrofotometer, sample dilewatkan pada panjang gelombang 260 dan panjang gelombang 280. Sedangkan A260/A280 menentukan tingkat kemurnian dari RNA, terdapat hubungan linear positif antara kemurnian RNA dengan ratio A260/A280. Kemurnian RNA yang ideal didapatkan dari proses isolasi RNA adalah 95-100% dengan absorbansi sebesar $2,00 \pm 0,05$, RNA dengan nilai ratio A260/A280 sama dengan 2,0 memiliki tingkat kemurnian sebesar 100%. Tingkat kemurnian RNA berbanding lurus dengan nilai absorbansi dan berkorelasi positif, dimana nilai rasio absorbansi sama dengan 2,0 maka sample tidak terkontaminasi [13].

Pengukuran konsentrasi DNA atau RNA dapat dilakukan mulai dari yang sederhana yaitu dengan gel sampai dengan modern yaitu dengan Nanovue Plus, gel

elektroforesis, dan teknologi chip seperti Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA), *Qubit Fluorometer*, dan Experion (Bio-Rad Laboratories, USA). Pengukuran kuantitas asam nukleat menggunakan alat UV spektrofotometer berupa cahaya UV yang ditembakkan ke sampel. Besaran serapan cahaya UV tergantung dari ukuran panjang gelombang cahaya yang diterima dari target contoh. Panjang gelombang dengan ukuran 240 nm mampu diserap oleh kontaminan, 260 nm untuk asam nukleat, 280 nm untuk protein dan 320 nm kemungkinan kontaminan juga. Tingkat kemurnian DNA yang baik dari hasil isolasi, sekitar 1,8-2,0. Kemurnian DNA di atas 2,0 kemungkinan terkontaminasi dengan RNA dan di bawah 1,8 terkontaminasi protein dan larutan fenol [14].

Kuantifikasi RNA umumnya mengukur kemurnian, konsentrasi protein, konsentrasi RNA, dan absorbansi. Nilai kemurnian didapatkan dari hasil ratio absorbansi A260/A280. Tingkat kemurnian RNA berbanding lurus dengan nilai absorbansi dan berkorelasi positif, dimana nilai rasio absorbansi sama dengan 2,0 maka sample tidak terkontaminasi atau bisa dibilang kemurniannya tinggi. Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari beberapa asam amino yang telah memiliki fungsi tertentu. Pada proses isolasi RNA, protein adalah salah satu molekul yang menyebabkan RNA terkontaminasi sehingga protein harus dieleminasi pada sampel tersebut. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan panjang gelombang 280. Konsentrasi RNA merupakan banyaknya RNA (μg) pada sample tersebut (mL), banyaknya RNA pada suatu sampel ditentukan oleh aktifitas organ sampel dan pengekspresian gen tertentu pada suatu organ.

Deteksi dan kuantifikasi asam nukleat merupakan hal yang sangat penting bagi penelitian di bidang biologi. Pada mulanya, DNA dan RNA sudah dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer untuk diukur absorbansinya pada panjang

gelombang 260 nm. Namun, metode yang sering dipakai ternyata kurang akurat dan kurang terpercaya. Pengukuran dengan absorbansi sinar UV konvensional ternyata kurang selektif dan tidak dapat membedakan antara DNA, RNA, atau protein. Nilai yang muncul seringkali dipengaruhi oleh kontaminan lainnya seperti nukleotida bebas, garam, dan senyawa organik, serta variasi komposisi basa. Terlebih lagi, sensitivitas metode spektrofotometri dengan Nanovue Plus juga kurang bisa mendeteksi kuantifikasi DNA dan RNA pada konsentrasi yang rendah. Alternatif baru dalam kuantifikasi asam nukleat adalah penggunaan *fluorescent dye*. Kuantifikasi dengan menggunakan *fluorescent* dinilai lebih sensitif karena dapat mengukur asam nukleat spesifik yang dikehendaki. *Qubit® fluorometric* merupakan salah satu metode kuantifikasi yang menggunakan prinsip *fluorescent dye*. *Qubit® fluorometric* lebih sensitif dan merupakan metode yang akurat untuk mengkuantifikasi asam nukleat dibandingkan metode absorbansi UV pada Nanovue Plus. Namun, *Qubit® fluorometric* dan Nanovue Plus dapat digunakan secara bersamaan untuk mendeterminasi konsentrasi DNA atau RNA. *Qubit® fluorometric* digunakan untuk pengukuran konsentrasi secara akurat, sedangkan Nanovue Plus digunakan untuk mengindikasikan adanya kontaminan [15].

Kuantifikasi *Qubit® fluorometric* mengkombinasikan flourometer dengan sensitivitas yang tinggi terhadap *fluorescent* yang ditambahkan kedalam sampel untuk mendeteksi konsentrasinya. *Qubit® Fluorometer* merupakan alat yang praktis dan mudah digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA, RNA, dan protein dengan dipadukan kit khusus untuk masing-masing sampel. Alat ini mudah dioperasikan serta menghasilkan hasil yang akurat dan cepat serta konsisten untuk berbagai macam penggunaan. Setiap kit *Qubit* yang telah dicampurkan digunakan untuk sekali analisis dan lebih sensitif

untuk mengukur konsentrasi jika dibandingkan dengan pengukuran berbasis absorbansi sinar UV. Volume sampel yang dapat dideteksi adalah sekitar 1-20 μL yang berarti tidak perlu membutuhkan dan membuang sampel terlalu banyak sehingga sisa sampel dapat digunakan untuk analisis lainnya, misalnya metode PCR [16].

Perbedaan mendasar antara Qubit® fluorometric dan kuantifikasi dengan absorbansi UV adalah Qubit® fluorometric dapat secara akurat menentukan konsentrasi asam nukleat yang dikehendaki secara cepat dan tepat meskipun kisaran konsentrasinya sangat kecil (jika dibandingkan dengan Nanovue Plus yang hanya dapat mendeteksi DNA, RNA, dan Protein). Adapun dengan Nanovue Plus, sampel dapat dideteksi adanya kontaminan dengan menggunakan perbandingan absorbansi 260/280 dan 260/230. Sampel yang mengandung asam nukleat kisaran nilai perbandingan absorbansi 260/280 yang didapat adalah 1,8 -2,0, jika lebih dari itu maka sampel terkontaminasi protein, dan apabila kurang maka sampel terkontaminasi RNA [17]. Namun alat ini tidak dapat untuk membedakan kontaminasi DNA oleh RNA begitupun sebaliknya. Perbedaan lainnya adalah pada Qubit® *fluorometric*, apabila ingin mengukur konsentrasi sampel. Kita harus mereaksikan beberapa reagen yang telah tersedia untuk masing masing sampel, sehingga membuat proses kuantifikasi menjadi kurang praktis, namun *mixture* antara sampel dan *assay kit* ini dapat bertahan hingga satu jam setelah pencampuran. Lain halnya dengan Nanovue Plus, kita dimudahkan dalam cara pengukurannya karena hanya dengan meneteskan 1 μL sampel, kita sudah dapat mengetahui hasil kuantifikasinya, namun setiap kali ingin mengganti sampel lain kita harus mengukur absorbansi blanko terlebih dahulu, tidak seperti Qubit® fluorometric yang absorbansi blankonya dapat disimpan dalam sistem mesin, sehingga kita tidak

perlu lagi mengukur absorbansi blanko. Perbedaan lainnya adalah dalam segi sampel yang digunakan, Qubit® fluorometric dapat mengukur sampel dengan volume 1-20 μL sedangkan Nanovue Plus hanya dapat mengukur sampel dengan volume 1 μL , dalam hal ini Qubit® fluorometric lebih bervariasi dalam menentukan jumlah spesimen yang kita ingin periksa

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa proses isolasi asam nukleat secara umum ada empat tahap yaitu melepaskan asam nukleat dari sel, denaturasi dari kompleks nukleoprotein, menghambat proses enzim RNase dan DNase dan pemisahan asam nukleat dari kontaminan. Tahapan setelah ekstraksi yaitu dilakukan kuantifikasi terhadap hasil ekstraksi. Kuantifikasi RNA dan DNA umumnya mengukur kemurnian, konsentrasi protein, konsentrasi RNA, konsentrasi DNA dan absorbansi. Pada penelitian kali ini, spesimen MP16 738 ILI dan MP16 751 ILI memiliki tingkat kemurnian yang mendekati 2,00. Tidak ada sampel yang memiliki tingkat kemurnian asam nukleat pada kisaran 1,8-2,0. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain dikarenakan rusaknya sampel karena terlalu sering di *freeze-thawing*, sampel terlalu lama dibiarkan pada suhu ruang sehingga terdenaturasi, proses ekstraksi yang kurang benar sehingga kontaminan ikut terbawa, serta beberapa faktor lainnya. Kurang murninya asam nukleat selama ekstraksi dapat menyebabkan terjadinya kerusakan enzim restriksi pada saat PCR.

Diperlukan jumlah sampel yang lebih banyak untuk memperoleh hasil bermakna secara statistik. Perlunya dilakukan studi molekular lanjutan terhadap sampel yang sudah diuji konsentrasi dan kemurniannya baik dalam pengerjaan sampel secara rutin di laboratorium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed yang telah memberikan ide dan membimbing penulisan hasil penelitian ini. Ucapan terima kasih kepada teman sejawat di Laboratorium Virologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah banyak membantu selama proses penanganan spesimen di penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. C. Sentilhes, C. Khamla, C. Olivier, S. Thongchanh, P. Darouny, V. Phengta, B. Paul, and B. Philippe. "Respiratory Virus Infections in Hospitalized Children and Adults in Lao PDR" *Influenza and Other Respiratory Viruses Journal*, vol.7(6), pp. 1070-1078, 2013.
- [2] WHO. *Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) yang Cenderung menjadi Epidemi dan Pandemi*. Jenewa: World Health Organization, 2010.
- [3] Y. P. Widodo, C. D. Rizki, & D. S. Lintang. Hubungan Perilaku Keluarga terhadap Kejadian Infeksi Saluran Pernafasan Atas (ISPA). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kesehatan*, 7(2), pp. 1-12. 2016.
- [4] WHO. *WHO Surveillance Case Definitions for ILI and SARI*. Jenewa: World Health Organization, 2010.
- [5] R. Hidayati dan R. Hidajah. Pola Peresepan Antibiotika Pada Kasus Infeksi Saluran Pernafasan Akut (Ispa) Di Klinik "X" Di Kota Malang Pada Bulan Mei-Desember 2008. *Farmasains : Jurnal Farmasi dan Ilmu Kesehatan*. Vol 1 No.1. 81-87. 2010.
- [6] C. Kim, JA. Ahmed, RB Eidex, R. Nyoka, LW. Waiboci, et al. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for the diagnosis of eight respiratory viruses by real-time reverse transcription-PCR assays. *PLoS One* 6: e21610. 2011.
- [7] J. Adiputra, S.H. Hidayat dan T.A. Damayanti. Evaluasi Tiga Metode Preparasi RNA Total untuk Deteksi Turnip Mosaic Potyvirus dari Benih *Brassica rappa* dengan Metode Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 8(2), pp. 44-49. 2012.
- [8] QIAGEN. *QIAamp® Viral RNA Mini Handbook*. 4th Ed. QIAGEN Companies. 2014.
- [9] J. Sambrook and D. W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York : Cold Spring Harbor. 2012.
- [10] Qubit. *Qubit® 3.0 Fluorometer User Guide. Catalog Number Q33216*. Life Technologies Company. 2014.
- [11] J. Mahony, M. Smieja, A. Petrich. Molecular diagnostics for viral respiratory infections. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48:217–249. 2011.
- [12] MK. Abraham, J. Perkins, GM. Vilke, CJ. Coyne. Influenza in the emergency department: vaccination, diagnosis, and treatment: clinical practice paper approved by American Academy of Emergency Medicine Clinical Guidelines Committee. *J Emerg Med* 50:536–542. 2016.
- [13] AC. van de Pol, TF. Wolfs, AM. van Loon, CE. Tacke, MC. Viveen, NJ. Jansen, JL. Kimpen, JW. Rossen, F. Coenjaerts. Molecular quantification of respiratory syncytial virus in respiratory samples: reliable detection during the initial phase of infection. *J Clin Microbiol* 48:3569–3574. 2010.
- [14] X. Li, Y. Wu, L. Zhang, Y. Cao, Y. Li, J. Li, et al. Comparison of Three Common DNA Concentration Measurement Methods. *Analytical Biochemistry*. 451:18-24. 2014.
- [15] M. O. Neil, J. McPartlin, K. Arthure, S. Riedel and N.D. Mc Millan. Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference qubit system. *J Phys Conference Series*. 307(1), pp. 1-6. 2011.

- [16] K. Phillips, N. McCallum, L. Welch, A comparison of methods for forensic DNA extraction: chelex-100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated), *Forensic Sci.Int. Genet.* 6. 282–285. 2012.
- [17] D.D. Richman, R. Whitley, and F.G. Hayden. *Clinical Virology*. 4th ed. Washington DC: ASM Press. 2016.