

OPTIMASI VOLUME TEMPLAT DNA DAN SUHU DENATURASI UNTUK DETEKSI *Brugia malayi* MENGGUNAKAN REAL-TIME PCR

Azzahra, Shafira¹; Merdekawati, Fusvita¹ Hardiana, Acep Tantan²; Mulia,
Yuliansyah Sundara¹; Ernawati³

¹ Jurusan Teknologi Laboratorium Medik, Politeknik Kesehatan Bandung, Indonesia

² PT Biofarma, Indonesia

³ Rumah Sakit Hasan Sadikin, Indonesia

E-mail : shafzah98@gmail.com

ABSTRAK

Filariasis limfatik telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia sejak lama, lebih dari 70% kasus filariasis di Indonesia disebabkan oleh *Brugia malayi*. Tes PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi daripada kebanyakan tes lainnya. Real-time PCR adalah suatu metode dengan menggunakan fluoresens yang dapat mendeteksi DNA *Brugia malayi*. Volume templat DNA dan suhu denaturasi adalah komponen yang perlu dioptimasi karena keduanya menentukan kualitas produk real-time PCR. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan volume templat DNA dan suhu denaturasi yang optimal untuk deteksi *Brugia malayi*. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen perbandingan kelompok statis. Variasi dari volume templat DNA yang dioptimasi adalah 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L dan 5 μ L sedangkan variasi dari suhu denaturasi yang dioptimasi adalah 93°C, 95°C dan 97°C. Pada penelitian ini templat DNA yang digunakan adalah templat DNA murni *Brugia malayi*. Data yang digunakan adalah data primer yang didapatkan dari pengukuran nilai Ct (*cycle threshold*) pada setiap reaksi yang di optimasi. Hasil menunjukkan bahwa volume templat DNA 5 μ L dan suhu denaturasi 93°C memiliki nilai Ct yang paling kecil. Pada penelitian ini, kondisi optimum untuk volume templat DNA adalah 5 μ L dan suhu denaturasi adalah 93°C.

Kata Kunci : *Brugia malayi*, Optimasi, Real-time PCR, Suhu Denaturasi, Templat DNA

ABSTRACT

Lymphatic filariasis has been a public health problem in Indonesia for a long time, more than 70% of filariasis cases in Indonesia are caused by Brugia malayi. PCR tests have a higher sensitivity and specificity than the other tests. Real-time PCR is a method using fluorescence that can be use to detect the DNA of Brugia malayi. Volume of DNA template and denaturation temperature are components that need to be optimized because it determines the quality of real-time PCR products. This study aims to determine the optimum of volume DNA template and denaturation temperature for detection Brugia malayi. The type of this research is statistica group comparison. Variations in the volume of optimized DNA templates are 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L and 5 μ L while variations in the denaturation temperature optimized are 93°C, 95°C and 97°C. In this study, the DNA template used was DNA template of Brugia malayi. The data used are primary data obtained from the measurement of the Ct (cycle threshold) in each reaction that is given a different assessment. The results showed that the volume of the 5 μ L DNA template and denaturation of 93°C had the smallest Ct value. In this experiment, the optimum condition for the volume of the DNA template is 5 μ L and the denaturation temperature is 93°C.

Keywords : *Brugia malayi*, Optimization, Real-time PCR, Denaturation, DNA Template

PENDAHULUAN

Filariasis limfatik telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia sejak lama, bahkan sejak tahun 1997 WHO telah menetapkan penyakit ini sebagai *neglected disease* yang menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia¹. Terdapat tiga spesies cacing penyebab filariasis yaitu: *Wuchereria bancrofti*; *Brugia malayi*; *Brugia timori*. Semua spesies tersebut terdapat di Indonesia, namun lebih dari 70% kasus filariasis di Indonesia disebabkan oleh *Brugia malayi*². *Brugia malayi* adalah endoparasit digenetik yang menggunakan nyamuk sebagai inangnya dan berbagai mamalia termasuk manusia sebagai inang definitif. Vektornya adalah nyamuk dengan genera *Aedes*, *Mansonia*, *Culex* dan *Anophles* dan habitatnya di rawa terbuka, hutan sawah beririgasi, hutan di Asia Selatan dan Timur³.

Tes laboratorium untuk mikrofilaria dapat dilakukan secara mikroskopis, tes serologi, dan PCR. Diagnosis secara mikroskopis, memiliki kelemahan pre-paten yang lama, dan memiliki sensitivitas yang rendah. Diagnosis dengan tes antibodi, memiliki sensitivitas yang baik namun memiliki spesifitas yang rendah. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dikembangkan untuk mendeteksi DNA parasit yang diekstraksi dari nyamuk atau dari sampel darah manusia. Secara umum, tes PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi daripada kebanyakan tes lainnya⁴. DNA *Brugia malayi* dari periode nokturnal dapat dideteksi oleh PCR dalam 200 µl sampel darah yang diambil pada malam atau siang hari atau setidaknya memiliki sensitivitas yang sama dengan 1 ml darah yang diambil pada malam hari⁵.

Pada umumnya, keberhasilan dalam memperoleh produk DNA pada metode ini dipengaruhi oleh templat DNA, DNA polimerase, konsentrasi

Mg²⁺, reaksi buffer PCR, konsentrasi dNTP, primer, dan optimasi proses PCR yang meliputi suhu *annealing* dan siklus. Meskipun suhu *annealing* merupakan parameter penting yang memengaruhi sensitivitas, suhu denaturasi juga dapat memengaruhi hasil^{6,7}.

Oleh karena itu, untuk memperoleh produk DNA hasil real-time PCR yang baik perlu dilakukan optimasi yang tepat pada volume templat DNA dan suhu denaturasi untuk deteksi *Brugia malayi*.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimen perbandingan kelompok statis (*statistica group comparision*) dengan menggunakan rancangan unit analisis. yang terdiri dari variabel independen dan variabel dependen. Variabel independen dalam penelitian ini adalah volume template DNA dan suhu denaturasi, sedangkan variabel dependen dalam penelitian ini adalah deteksi *Brugia malayi*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung pada bulan Maret – Mei 2019 . Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah real-time PCR ESCO swift 48. Data yang digunakan adalah data primer yang didapatkan dari pengukuran nilai Ct (*cycle threshold*) pada setiap reaksi yang diberi perlakuan berbeda. Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah kurva amplifikasi fluoresens terhadap siklus.

Pada penelitian ini reagen yang digunakan adalah Kit HRM SensiFAST™ dengan primer SLX untuk *Brugia malayi*. Primer tersebut didesain dari gen 5S rRNA dan *spliced leader sequence* SL1. (No.Asesi GenBank : D87037)⁸. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah templat DNA *Brugia malayi*. Untuk validasi dilakukan

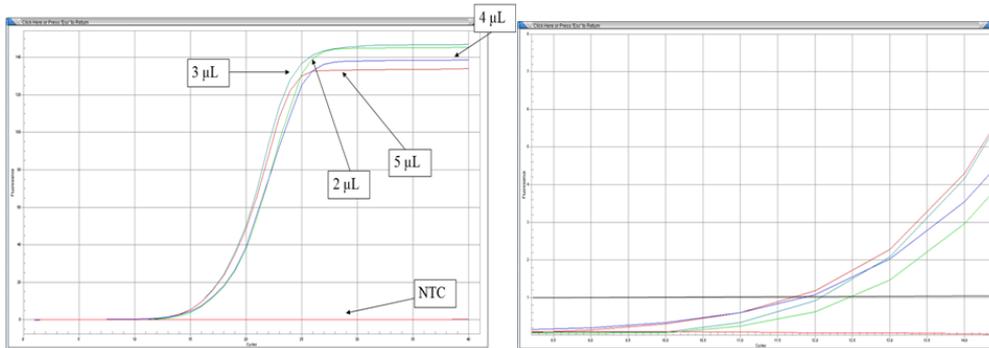
kontrol negatif yaitu NTC (*No Template Control*) yang tidak mengandung DNA target dengan menggunakan *nuclease free water*. Protokol PCR yang digunakan mengacu pada Korean J

Parasitol⁹. Variasi volume templat DNA yang digunakan adalah 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, dan 5 μ L sedangkan variasi suhu denaturasi yang digunakan adalah 93°C, 95°C, dan 97°C.

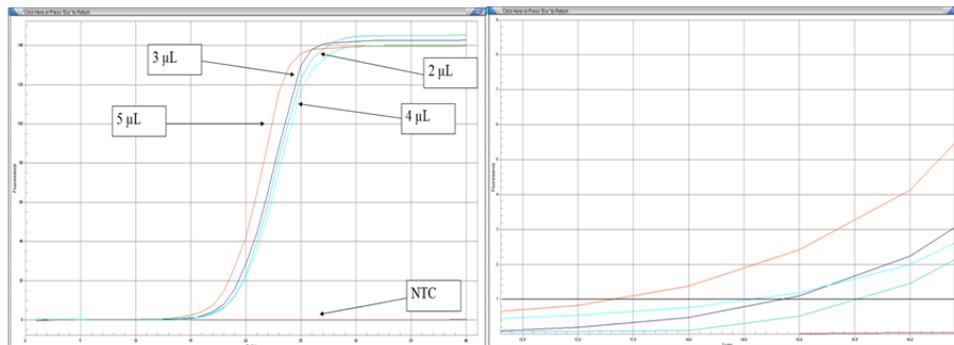
HASIL

Pada penelitian ini dilakukan optimasi volume templat DNA dan suhu denaturasi dengan menggunakan real-time PCR.

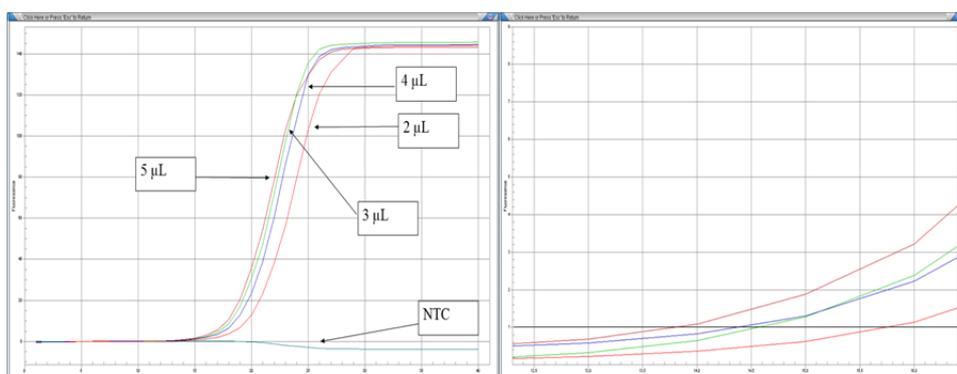
Panjang ampikon untuk *Brugia malayi* adalah 196 bp. Pada NTC menunjukkan tidak adanya fluoresensi.



Gambar 1. Kurva amplifikasi optimasi volume templat DNA pada suhu denaturasi 93°C



Gambar 2. Kurva amplifikasi optimasi volume templat DNA pada suhu denaturasi 95°C



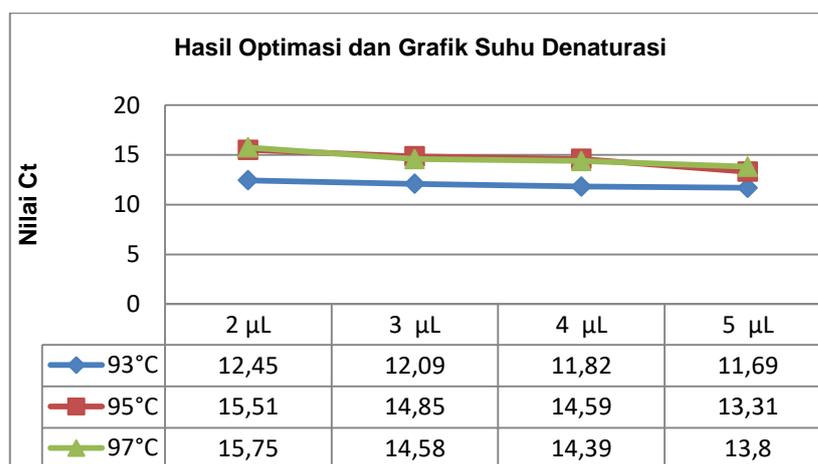
Gambar 3. Kurva amplifikasi optimasi volume templat DNA pada suhu denaturasi 97°C

Pada hasil optimasi volume templat DNA didapatkan hasil nilai Ct yang paling kecil adalah volume templat

DNA 5 μ L. Pada suhu 93°C memiliki nilai Ct 11,69. Pada suhu 95°C memiliki nilai Ct 13,31. Pada suhu 97°C memiliki nilai

Ct 13,80. Hal ini sesuai dengan teori, dimana pada suhu denaturasi 93°C, 95°C dan 97°C nilai Ct yang pertama kali muncul adalah jumlah volume templat DNA yang paling besar yaitu 5 µL. Kemudian nilai Ct selanjutnya muncul pada jumlah volume templat DNA 4 µL, 3 µL, dan 2 µL. Templat DNA dengan

jumlah volume 2 µL memiliki nilai Ct yang paling besar. Untuk dapat melihat hasil optimasi dan grafik dari optimasi suhu denaturasi 93°C, 95°C dan 97°C dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Optimasi dan Grafik Suhu Denaturasi

Pada Gambar 4. terlihat bahwa pada suhu denaturasi 95°C dan 97°C Nilai Ct nya tidak jauh berbeda, yaitu berkisar antara 13 sampai 15. Tetapi, pada suhu

denaturasi 93°C terdapat perbedaan hasil dimana Ct yang dihasilkan muncul lebih awal daripada suhu denaturasi 95°C dan 97°C, yaitu berkisar antara 11 sampai 12.

PEMBAHASAN

Optimasi Volume Template DNA

Berdasarkan hasil optimasi volume templat DNA dengan variasi 2 µL, 3 µL, 4 µL dan 5 µL menunjukkan bahwa perbedaan volume templat DNA memberikan nilai Ct yang berbeda. Ct suatu reaksi ditentukan terutama oleh jumlah templat yang ada pada awal reaksi amplifikasi. Jika jumlah templat DNA pada awal reaksi tersedia banyak maka relatif sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan agar produk memberikan sinyal fluoresensi, sehingga reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang rendah. Sebaliknya, jika yang jumlah templat DNA yang tersedia sedikit, dibutuhkan siklus amplifikasi yang lebih banyak agar produk memberikan sinyal fluoresen. Dengan demikian, reaksinya akan menghasilkan nilai Ct yang tinggi¹⁰.

Semakin tinggi Ct yaitu pada siklus 30-35, semakin sedikit DNA yang

terdeteksi. Jika Ct memiliki nilai yang kecil yaitu pada siklus 10-15, maka DNA yang terkandung sangat banyak¹¹. Pada optimasi ini templat DNA *Brugia malayi* memiliki kisaran nilai Ct 11,69 sampai 15,75. Kisaran nilai Ct tersebut menunjukkan adanya amplifikasi pada *Brugia malayi* dengan jumlah yang sangat banyak. Namun, dalam hal ini nilai Ct yang didapat tidak memiliki perbedaan yang begitu jauh dan semua produk dapat teramplifikasi sehingga semua volume templat DNA dapat mengamplifikasi produk.

Optimasi Suhu Denaturasi

Menurut penelitian Yap dan McGee (1991) untuk meningkatkan hasil produk PCR dapat digunakan denaturasi dengan suhu yang rendah. Aktivitas Taq polimerase dapat ditingkatkan dengan penggunaan suhu denaturasi yang lebih rendah pada siklus selanjutnya, dan menghasilkan tanda yang lebih jelas

pada hasil produk menggunakan PCR konvensional¹². Namun efisiensi tidak meningkat ketika hasil produknya sudah tinggi, hal ini dapat dikarenakan faktor terbatas lainnya seperti primer, nukleotida atau pirofosfat.

Hal ini sesuai dengan teori, dimana pada suhu denaturasi 93°C, 95°C dan 97°C nilai Ct yang pertama kali muncul adalah pada suhu denaturasi yang paling rendah yaitu suhu denaturasi 93°C. Pada denaturasi suhu 95°C dan 97°C nilai Ct nya tidak jauh berbeda. Tetapi, pada suhu denaturasi 93°C terdapat perbedaan hasil dimana Ct yang dihasilkan muncul lebih awal daripada suhu denaturasi 95°C dan 97°C, yaitu berkisar antara 11 sampai 12. Dalam hal ini walaupun pada nilai Ct terdapat perbedaan, namun tidak mempengaruhi hasil produk. Semua suhu denaturasi dapat mengamplifikasi produk.

DAFTAR RUJUKAN

1. World Health Organization, 2011, *Global Programme to Eliminate. Monitoring and Epidemiological Assessment of Mass Drug Administration: Lymphatic Filariasis. Manual for National Elimination Programmes*, World Health Organization.
2. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi, 2010, Filariasis di Indonesia Tahun 2015, Buletin Jendela Epidemiologi, Volume 1, ISSN 2087-1546.
3. Neeta Sehgal, D.K. Singh, Pawan Malhotra, Kapinder, Haren Ram Chiary, et al, 2017, *Biology of Parasitism Morphology, Life cycles, Mode of entry of Brugia*, e-PG Pathshala, New Delhi. Dalam: http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000035ZO/P000888/M020582/LM/1498560723MorphologyBrugiaQuad3.pdf. Dikutip tanggal 01 Oktober 2018.
4. Paul E. Simonsen, Mwele N. Malecela, Edwin Michael, Charles D.

SIMPULAN

Real-time PCR mempunyai sensitivitas dan ketahanan yang lebih tinggi, serta dapat mengukur kuantitas jumlah awal DNA target yang terdapat pada sampel. Dengan menggunakan sampel klinis, metode ini lebih tepat digunakan untuk mengevaluasi keberhasilan pada program eliminasi filariasis limfatik, terutama dalam membantu mengevaluasi pasca pengobatan filariasis limfatik. Pada penelitian ini volume templat DNA yang optimum untuk deteksi *Brugia malayi* dengan metode real-time PCR adalah 5 µL dan suhu denaturasi optimum untuk deteksi *Brugia malayi* dengan metode real-time PCR adalah 93°C.

Disarankan untuk penelitian selanjutnya dapat menggunakan spesimen klinis, serta menggunakan kurva standar agar dapat mengetahui konsentrasi DNA.

- Mackenzie, 2008, *Lymphatic Filariasis: Research and Control in Eastern and Southern Africa*, DBL – Centre for Health Research and Development, ISBN: 87-91521-08-4.
5. Peter Fischer Daniel Boakye, Joseph Hamburger, 2002, *Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Lymphatic Filariasis*, Springer. - Vol. Med Microbiol Immunol (2003) 192: 3–7.
6. Blirt, 2016, *PCR Optimization and Troubleshooting*. Dalam: <http://dnagdansk.com/media/Downloads/pcr-optimization-and-troubleshooting.pdf> Dikutip tanggal 13 Oktober 2018.
7. Suzanna Kennedy Nick Oswald, 2011, *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, Caister Academic Press.
8. NCBI, 1999, *Brugia malayi 5S rRNA gene and spliced leader sequence SL1*. Dalam: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Dikutip tanggal 27 Februari 2019.
9. Tongjit Thanchomnang, Pewpan M. Intapan, Chairat Tantrawatpan et. al,

- 2013, *Rapid Detection and Identification of Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. pahangi, and Microfilaria immitis in Mosquito Vectors and Blood Samples by High Resolution Melting Real-Time PCR*, Thailand: Desember, No. 6; 645-650 : Vol. 51. - ISSN (Online) 1738-0006.
10. Bio-rad, 2006, *Real-time PCR Applications Guide*, Bio-rad Laboratories, Inc.
11. Genomic Platform Institute, 2011, *Understanding qPCR Results*, Genomique. Dalam: http://genomique.irc.ca/resources/files/Understanding_qPCR12_R_results/ . Dikutip tanggal 21 Mei 2019.
12. Eric Yap, James O'D.McGee, 1991, *Short PCR Product Yields Improved by Lower Denaturation*, Oxford UK, Oxford Unity Press, Volume 19.