

AMPLIFIKASI *PCR* DOMAIN D1/D2 28S rDNA MENGGUNAKAN PRIMER *ITS1* DAN *ITS4* SAMPEL DNA DARI *Candida tropicalis* YANG DIISOLASI DENGAN METODE PENDINGINAN

Hermansyah^{1*}, Novian Sutami¹, dan Miksusanti¹

¹Jurusan Kimia MIPA Universitas Sriwijaya, Jalan Raya Palembang Prabumulih
KM 32 Indralaya, Ogan Ilir, Sumatera Selatan

*Corresponding author: hermansyah@unsri.ac.id

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May
2018

Accepted 28 May
2018

Available online
26 June 2018

Keywords:

Yeast *C. tropicalis*
DNA isolation
cooling method
PCR
Electrophoresis

ABSTRACT

The purpose of this research was to isolated DNA from the yeast *C. tropicalis* with freeze thawing method -20⁰ C conducted on 3 colonies of *C. tropicalis*. Each colony threated variations of cooling, 3x15 minutes, 3x25 minutes and 3x35 minutes, to break the cell walls. Subsequently all the samples amplified with 3 variations of *PCR* cycles, 15 cycles, 25 cycles and 35 cycles, after all of the samples isolated by freeze thawing method -20⁰ C. Its was known that sample A₁₅ has the smallest concentration of DNA yeast *C. tropicalis*, ie 50 µg/mL, while sample C₃₅ had the largest concentration of DNA yeast *C. tropicalis*, ie 225 µg/mL. The result of the research indicated that the best condition can be reached in 3x35 minutes. On 35th cycle has clearer *C. tropicalis* DNA bands than the 25th and 15th *PCR* cycle. *C. tropicalis* DNA bands at 35th cycles there were 7 DNA bands were detected and bright bands on a long 35 minutes cooling. In the 25th and the 15th cycle, there was no DNA bands were detected in all samples. Based on the results obtained, the amplification process must be carried out at least 35 times cycles so that the *C. tropicalis* DNA bands can be detected.

© 2018 IJoPAC. All rights reserved

1. Pendahuluan

Candida adalah jamur golongan *yeast* yang terdiri dari banyak spesies, namun hanya sekitar 17 spesies yang dilaporkan dapat menginfeksi manusia. Spesies tersebut antara lain *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*. Beberapa metode telah dilakukan untuk mengidentifikasi spesies *Candida* misalnya dengan cara fermentasi, asimilasi dan secara molekuler. *Candida tropicalis* telah diidentifikasi sebagai spesies *yeast* patogen yang umum dari kelompok *Candida non albicans* [1].

Pada penelitian ini metode yang digunakan untuk menganalisis DNA dari sel *Candida tropicalis* secara molekuler menggunakan *PCR* yaitu suatu metode enzimatis untuk amplifikasi DNA dengan cara *invitro*. Pada proses *PCR* diperlukan beberapa komponen utama yaitu sampel, DNA cetakan, enzim DNA polimerase, oligonukleotida primer, (dNTP) deoksiribonukleotida trifosfat, dan komponen pendukung lain adalah senyawa buffer.

Menurut [2], umumnya daerah yang digunakan untuk identifikasi *yeast* hingga tingkat spesies yaitu daerah *ITS* dan D1/D2 gen LSU. Daerah D1/D2 adalah daerah sepanjang 600 nukleotida dari ujung 5' gen LSU rRNA. Daerah *ITS1* dan *ITS2* yang mengapit gen 5,8S. Daerah tersebut pada *yeast* umumnya berukuran 300-900 pb [3].

Variasi sequence yang lebih tinggi dari daerah D1/D2 LSU dimiliki oleh daerah *ITS* karena daerah tersebut merupakan daerah *noncoding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (SSU dan LSU). Oleh karena itu analisis sequence daerah *ITS* dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies-spesies yang berkerabat dekat [4].

Domain D1/D2 adalah domain 600 nukleotida pada ujung 5' dari subunit besar (28S) DNA. Sebuah studi oleh [5] menunjukkan bahwa sebagian besar spesies *yeast* dapat diidentifikasi dari urutan perbedaan domain D1/D2. Studi lebih dari 500 spesies *yeast ascomycetous* telah menunjukkan bahwa strain sejenis umumnya memiliki kurang dari 1% nukleotida substitusi dalam domain ini, sedangkan spesies biologi dipisahkan oleh lebih dari jumlah substitusi tersebut.

Identifikasi molekuler memerlukan tahapan awal yaitu isolasi DNA genom. Prinsip isolasi DNA yaitu mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya. Tahapan utama pada isolasi DNA *yeast* yaitu penghancuran dinding sel *yeast*. Proses tersebut dapat dilakukan dengan metode mekanik dan lisis. Metode isolasi yang digunakan mempengaruhi kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Contoh metode mekanik untuk menghancurkan dinding sel *yeast* antara lain yaitu penggunaan sonikasi, mortar (*grinding*), dan *boiling*. Metode isolasi DNA *yeast* secara mekanik dapat dilakukan dengan cepat namun kualitas DNA yang dihasilkan tidak terlalu baik [5].

Keberhasilan amplifikasi DNA pada *PCR* ditentukan oleh ketersediaan sampel DNA sebagai template, DNA taq polymerase, primer, oligonukleotida, buffer. Ketersediaan sampel DNA sebagai template (cetakan) akan sangat dipengaruhi metode isolasi DNA yang digunakan. Dinding sel *C. tropicalis* dapat dilisis dengan berbagai cara misalnya secara enzimatik, dengan berbagai zat kimia maupun secara fisik seperti pendinginan pada *freezer*.

Metode lisis yang umum digunakan antara lain yaitu penggunaan bahan-bahan kimia dan beberapa enzim yang dapat menyebabkan lisis dinding sel *yeast*. Contoh bahan-bahan kimia tersebut yaitu nitrogen cair dan *sodium dodecylsulfate (SDS)*, sedangkan contoh enzim yang dapat digunakan dalam proses isolasi DNA *yeast* yaitu *zymolyase* maupun *lyticase*. Isolasi DNA juga dapat menggunakan kit komersial yang merupakan penggabungan antara metode lisis dan mekanik, contohnya yaitu *wizard® genomic DNA purification kit* [6]. Baik metode mekanik maupun metode lisis memerlukan bahan-bahan yang relatif mahal. Oleh karena itu pada penelitian ini isolasi DNA menggunakan teknik yang sederhana, mudah dan murah yaitu mengisolasi dengan cara pendinginan di dalam *freezer* pada suhu -20° C dapat merusak dinding sel walaupun hasilnya tidak sama. Metode pendinginan di dalam *freezer* pada suhu -20° C dan dilakukan vortex dapat merusak dinding sel sehingga isolasi DNA dapat digunakan template DNA untuk diamplifikasi *PCR* dan elektroforesis, dengan berhasilnya metode ini, ada kemungkinan metode ini dapat digunakan untuk spesies *Candida* yang lain, sehingga dapat membantu isolasi DNA dengan mengidentifikasi spesies-spesies *yeast Candida*.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *yeast C. tropicalis*, media Sabouroud yang terdiri atas 1% pepton, 4% glukosa, dan 1% bakto agar, spiritus, media cair (1% pepton dan 4% glukosa), larutan buffer TAE, alkohol 70%. buffer *PCR* terdiri dari ; (100 mM

Tris} pH HCl 3-8, 15 mM MgCl₂ 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 1 µL dNTP (10 mM), 5 µL setiap primer (10 M), 0-5 µL (2-5 U) polimerase Taq DNA dan 50 µL akuades steril.

2.2. Metode

Persiapan Media Sabouroud

Media Sabouroud Agar disiapkan dengan cara berikut : bakto agar sebanyak 1 g ditambahkan 1 g pepton dan 4 g glukosa dilarutkan di dalam 120 mL akuades steril dibuat di dalam erlenmeyer 250 mL di aduk hingga homogen dipanaskan menggunakan penangas hingga larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121^o C, tekanan 1 atm selama 15 menit [7]. Media cair Sabouroud disiapkan dengan cara yang sama tetapi tanpa penambahan bakto agar. Media agar didinginkan hingga suhu 65^o C kemudian dituangkan ke 3 cawan petri masing-masing 30 mL secara aseptik, dibiarkan hingga memadat.

Peremajaan yeast *C. tropicalis*

Teknik pemurnian *yeast* dilakukan berdasarkan metode gores menggunakan jarum ose dan digoreskan ke permukaan medium sabouroud agar dengan pola zig-zag dengan harapan pada ujung goresan hanya sel-sel *yeast* tunggal yang terlepas dari ose dan menempel ke medium. Sel-sel *yeast* tunggal ini akan membentuk koloni tunggal yang kemudian dapat dipindahkan ke medium, selanjutnya agar didapatkan biakan murni, proses pemurnian *yeast* dilakukan dengan cara memindahkan satu ose *yeast* pada medium selektif secara aseptik. *Yeast* kemudian diinkubasi dengan posisi terbalik dalam inkubator pada suhu 37^o C selama 24 jam, setelah 24 jam akan terlihat koloni-koloni *yeast C. tropicalis* tumbuh.

Pembuatan inokulum yeast *C. tropicalis*

Kultur dibuat dengan mengambil satu koloni *C. tropicalis* dengan jarum ose lalu dipindahkan secara perlahan ke dalam media cair, pekerjaan dilakukan secara aseptik di ruang *laminar airflow*. Kultur dibuat dari 3 koloni *yeast C. tropicalis* yang berbeda, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 24 jam, pertumbuhan sel akan terlihat dengan media cair akan menjadi keruh.

Pengukuran Optical Density (OD) dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Larutan blanko dibuat 500 µL akuades steril dan 500 µL media cair tanpa isolat *yeast C. tropicalis* dimasukkan kedalam kuvet. Larutan sampel dibuat 900 µL akuades steril dan 100 µL media cair yang berisi sel *C. tropicalis* dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur OD dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada λ₆₆₀ nm. Berdasarkan data OD dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel *C. tropicalis*.

Isolasi DNA yeast *C. tropicalis* dengan menggunakan Metode Pendinginan

Sampel isolat *yeast C. tropicalis* diambil dari media cair pada 3 tabung reaksi yang berisi kultur *C. tropicalis* untuk metode pendinginan di sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 12.000 rpm, kemudian diambil pelet sel dan dibuang supernatannya. Pada setiap tabung diambil pelet sebanyak 10 µL untuk 3 *tube ependorf* yang berbeda dan ditambahkan 200 µL akuades steril masing masing *tube ependorf* di *vortex* selama 45 detik, lalu dilakukan metode dengan menggunakan *freeze thawing*, didinginkan pada suhu -20^o C masing-masing pada temperatur 3 x 15; 3 x 25, dan 3 x 25 menit dengan 3x pengulangan.

Isolasi DNA dengan Metode Standar

Total DNA genom diisolasi dari kultur fase seimbang. Sel sel yang dikultur di dalam 50 mL tabung berisi 10 mL YPDA kaldu pada suhu 30° C dengan kecepatan sentrifugasi 200 rpm. Sel dipanen menggunakan sentrifugasi 5000 rpm di 4° C dalam waktu 5 menit, dicuci dengan 20 mL air steril sebanyak 3 kali, disuspensi dalam 200 µL lisis penyangga (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA dan 0.5% SDS), lalu lisis pada vortex mixer dengan kecepatan tinggi pada 0.2 g gelas kaca, setelah ada gangguan terhadap sel, disentrifugasi pada 5000 rpm dan 4° C dalam waktu 5 menit. Supernatan dikumpulkan di dalam mikrosentrifugasi, dan 500 µL campuran fenol, kloroform, isoamylalkohol dalam rasio 25:24:1 (v/v/v) telah ditambahkan, selain itu, campuran tersebut dicampurkan dengan cara dilakukan vortex, dan disentrifugasi pada 12000 rpm dan 4° C dalam waktu 10 menit dan dipindahkan ke sebuah 1,5 mL mikrosentrifuge baru. Satu mL etanol 95% (v/v) dicampurkan ke supernatan dan langsung dicampur dengan inversi, kemudian disimpan pada 20° C dalam waktu 2 jam untuk memicu DNA yang genom, selanjutnya sampel tersebut di sentrifugasi pada 12000 rpm dan 4° C dalam waktu 10 menit. Supernatan dengan hati-hati dibuang untuk mempertahankan butir DNA yang genom, setelah itu 1 mL 75% (v/v) air dingin/es etanol digunakan untuk mencuci butir DNA genom sebanyak tiga kali, dan butir DNA dikeringkan di inkubator pada 37° C dalam waktu satu jam. Genom DMA disuspensi dalam 200 µL air steril dan disimpan pada -20° C untuk digunakan pada saat elektroforesis [8].

Menentukan Konsentrasi DNA *C. tropicalis*

Sampel *yeast C. tropicalis* yang telah diisolasi dengan metode pendinginan sehingga didapat DNA *yeast C. tropicalis* untuk menghitung konsentrasi DNA. Pada pembuatan larutan blanko diambil sebanyak 1 mL akuades steril dimasukkan ke dalam kuvet. Pada larutan sampel diambil 10 µL kultur *C. tropicalis* yang telah diisolasi (pada *tube ependorf*), dimasukkan ke dalam kuvet ditambahkan 990 µL akuades steril, diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada λ_{260} nm.

Amplifikasi DNA yeast *C. tropicalis* dengan menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplifikasi DNA *C. tropicalis* dilakukan dengan menggunakan *PCR JumpStart™ REDTaq™ ReadyMixa Reaction Mix*, sesuai dengan protokol dari perusahaan yang terdiri atas : 20 mM Tris-HCl pH 8,3 4 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP), 0,002% gelatin, *inert dye, stabilizers*, 0.1 unit/mL Taq DNA Polymerase, JumpStart Taq antibody. Reagen tersedia 20, 100 dan 800 reaksi (volume reaksi default adalah 50 uL). Amplifikasi *PCR* dibuat campuran reagen sebanyak 10 µL dengan komposisi : ReadyMixa Reaction Mix 5 µL, Primer ITS1 10 5 µM 0,1 5 µL, Primer ITS4 10 5 µM 0,1 5 µL, DNA sample 3 10 5 µM 0,1 5 µL), air steril 1,8 µL. Amplifikasi menggunakan PCR dilakukan dengan kondisi sebagaiberikut : denaturasi 94° C selama 2 menit, pada *annealing* 55°-68° C selama 30 detik, *extension* 72° C selama 2 menit diikuti satu siklus final ekstensi 72° C selama 5 menit.

DNA elektroforesis

Gel agarosa 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 g agarosa dengan 100 mL TAE (*Tris Acetate EDTA*) 1x, dididihkan dengan menggunakan penangas hingga larutan menjadi bening dan mendidih, kemudian larutan agarosa dituang pada *gel caster* dan disisipkan sisir (*comb*) untuk membuat sumur, dibiarkan hingga padat. Gel diletakkan pada *chamber* elektroforesis, dengan posisi sumur pada muatan (-), kemudian buffer TAE dituangkan hingga gel terendam, dengan tidak melebihi garis batas maksimum buffer. Sampel DNA *yeast C. tropicalis* dan larutan

loading dye dengan perbandingan (1:1) dimasukkan pada masing-masing sumur, selanjutnya elektroda dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan hingga 50 menit, pada voltase 220V. Gel agarosa kemudian direndam ke dalam larutan etidium bromida selama ± 20 menit, kemudian dimasukkan ke dalam *gel documentation* untuk mengamati hasil pita DNA yang teramplifikasi dan mendokumentasikan hasil elektroforesis.

3. Hasil dan Pembahasan

Koloni *C. tropicalis* merupakan eukaryot tingkat rendah memiliki karakter morfologi mirip seperti *yeast* lainnya. Sehingga untuk mengidentifikasi spesies perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut misalnya melalui uji biokimia asimilasi atau fermentasi, atau karakter urutan DNA nya. Yeast *C. tropicalis* diremajakan pada media agar sabouroud di dalam cawan petri, diinkubasi selama 24 jam seperti pada Gambar 1. Ciri-ciri makroskopik yang umumnya diamati yaitu warna, profil, serta tepi koloni pada medium padat dan keberadaan endapan (*sediment*), pelikel (*pellicle*), cincin (*ring*), dan pulau-pulau (*islets*) pada medium cair [6],[9]. Koloni tersebut berwarna kuning dan sebagian koloni berbentuk koloni tunggal, koloni *C. tropicalis* berukuran $3,0\text{-}5,5 \times 4,0\text{-}9,0 \mu\text{m}$ sehingga yang diambil menggunakan jarum ose koloni yang tidak terkontaminasi dan berbentuk tunggal.



Gambar 1. Kultur *C. tropicalis* dalam media agar sabouroud setelah diinkubasi shaker pada suhu ruangan selama 24 jam.

Hasil Isolasi DNA C. tropicalis dengan cara Pendinginan di dalam Freezer pada Suhu -20° C.

DNA diisolasi dari isolat koloni yang dikultivasi pada selama 18 jam hingga fase eksponensial yaitu pada saat kultur sel memiliki kerapatan optis atau OD₆₆₀ lebih kurang 1,0. Sel yang dikumpulkan dengan cara sentrifugasi untuk selanjutnya dilisis dengan metode free thawing Pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa kultur *yeast C. tropicalis* yang sudah diremajakan dibuat pada media cair diinkubasi shaker selama 24 jam.

Setelah kultivasi terlihat kultur menjadi keruh karena jumlah sel semakin meningkat. Sel dikumpulkan pada fase eksponensial yaitu ketika kultur memiliki OD $\lambda_{660 \text{ nm}} = 1.0$ seperti yang terlihat pada Gambar 2, selanjutnya sel dilisis dengan metode pendinginan.

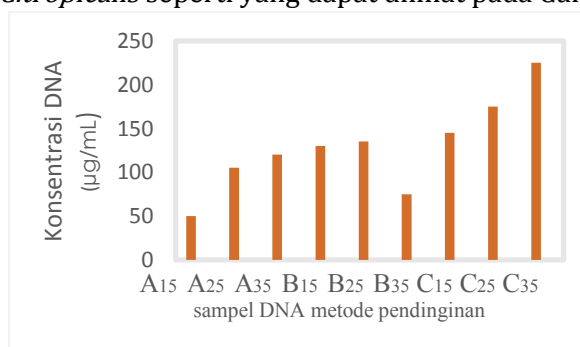


Gambar 2. Kultur sel setelah diinkubasi selama 18 jam berada dalam fase eksponensial memiliki $OD_{660} = 1.0$

C. tropicalis dapat dipecah atau dilisis dinding selnya dengan metode pendinginan di dalam *freezer* -20°C . Metode ini simpel, murah, dan cepat. Dengan menggunakan variasi waktu pendinginan 15, 25 dan 35 menit sel menjadi rigid sehingga ketika di vorteks selama 45 detik sel akan mudah rusak. Untuk mendapatkan hasil lisis yang lebih sempurna, sel di dinginkan dan di vorteks sebanyak 3 kali.

Konsentrasi DNA C. tropicalis menggunakan Spektrofotometri UV-VIS pada $\lambda_{260}\text{ nm}$.

Pengukuran kuantitas dan kualitas DNA dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri. Sampel yang mengandung DNA dan RNA memiliki absorbansi maksimal pada $\lambda_{260}\text{ nm}$. Kuantitas DNA dalam suatu sampel dapat dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Sebuah sampel memiliki nilai absorbansi 1 pada $\lambda_{260}\text{ nm}$ memiliki konsentrasi DNA sebanyak $50\mu\text{g/mL}$ (Rapley and Heptinstall, 1998). Hasil pengukuran konsentrasi DNA terhadap hasil lisis kultur *C.tropicalis* seperti yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Konsentrasi DNA *C. tropicalis* yang dihasilkan pada berbagai waktu pendinginan. A₁₅; A₂₅; A₃₅ = sampel *C.tropicalis* koloni A dengan pendinginan dalam *freezer* tiga kali 15, 25 dan 35 menit. B₁₅; B₂₅; B₃₅ = sampel *C.tropicalis* koloni B dengan pendinginan dalam *freezer* tiga kali 15, 25 dan 35 menit. C₁₅; C₂₅; C₃₅ = sampel *C.tropicalis* koloni C dengan pendinginan dalam *freezer* tiga kali 15, 25 dan 35 menit.

Pada Gambar 3. menunjukkan bahwa nilai konsentrasi DNA dari *C. tropicalis* baik koloni A, B ataupun C, makin meningkat waktu pendinginan menyebabkan umumnya lisis sel semakin baik yang ditandai dengan meningkatnya jumlah DNA. Dengan waktu pendinginan 15, 25, dan 35 menit, umumnya pendinginan 35 menit lebih baik dari 25 menit, dan lebih tinggi dari 15 menit. Kecuali pada koloni B, dimana pendinginan 35 menit menghasilkan DNA yang lebih kecil dari 25 menit. Sedangkan diantara koloni A, B dan C baik pada pendinginan 15, 25, dan 35 menit, jumlah DNA tertinggi terdapat pada koloni C. DNA. Konsentrasi yang tertinggi pada lama pendinginan 35 menit menghasilkan konsentrasi DNA $225\mu\text{g/mL}$.

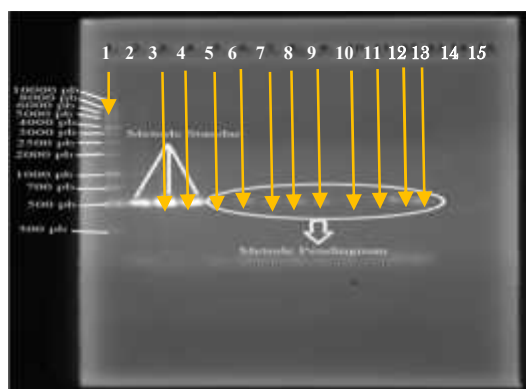
Amplifikasi DNA dengan *PCR* dalam berbagai Siklus *PCR* yang dideteksi dengan Elektroforesis

Berdasarkan hasil siklus *PCR* yang telah dilakukan, pada 35 siklus hasil pembacaan template DNA pada elektroforesis paling tinggi dibandingkan dengan 25 dan 15 siklus *PCR*, terlihat pada 35 siklus, template DNA yang terbaca 8 buah sampel terdiri dari 2 buah sampel pendinginan pada *freezer* 15 menit, dan 3 buah sampel pendinginan pada *freezer* 25 menit, serta 3 buah sampel pendinginan didalam *freezer* 35 menit.

Pada 25 siklus amplifikasi DNA yang diamati menggunakan sampel DNA yang diisolasi dengan pendinginan tidak ada yang terdeteksi, sementara amplifikasi DNA sampel yang diisolasi dengan metode standar dapat dideteksi. Pada 15 siklus *PCR* baik sampel standar DNA maupun sampel yang diuji tidak ada yang terdeteksi hal ini disebabkan baik 15 siklus maupun 25 siklus *PCR* belum bisa digunakan untuk pengujian sampel karena siklus tersebut terlalu singkat untuk pemanjangan untai DNA, sehingga kondisi terbaik untuk amplifikasi *PCR* pada *freeze thawing* harus pada 35 siklus agar dapat dideteksi dengan menggunakan elektroforesis.

Amplifikasi gen 28S rDNA memiliki kualitas pita produk yang terlihat terang dan tebal, serta sejajar satu sama lain dimana menghasilkan pola pita tunggal DNA yang menandakan bahwa primer dan suhu *annealing* yang digunakan sudah tepat. Hasil amplifikasi *PCR* fragmen gen pengkode 28S rDNA menggunakan pasangan primer ITS1 dan ITS4 seperti pada Gambar 4. Hasil ini jika dibandingkan dengan pita yang dihasilkan amplifikasi DNA menggunakan template DNA yang dilisis dengan protokol standar yang digunakan pada bidang yeast genetic molecular kurang terang pitanya, walaupun masih dapat dilihat dengan baik.

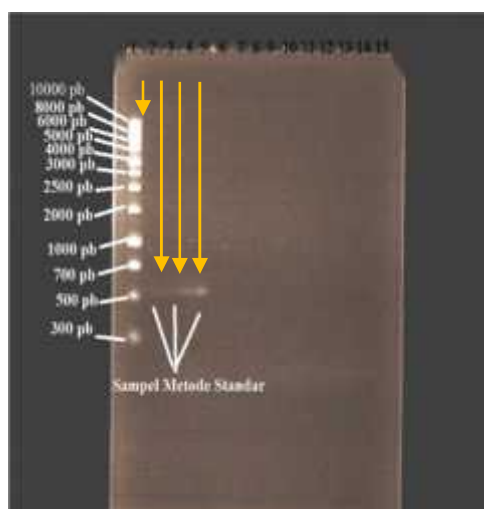
Berdasarkan hasil yang didapat seperti terlihat pada Gambar 5. pita yang tidak terlihat dimiliki oleh isolat 5. Pada lajur 6,7,8,9,12 dan 13 menunjukkan pita DNA yang menyala terang. Menurut Restu *et al.*, (2012), produk isolasi DNA yang berkualitas baik ditunjukkan dengan pita DNA yang terlihat tebal dan bersih, serta pita DNA yang menyala terang. Lajur 5 tidak memperlihatkan adanya pita DNA, hal ini dimungkinkan karena konsentrasi DNA yang dihasilkan pada saat isolasi DNA terlalu rendah sehingga tidak dapat diamplifikasi menggunakan *PCR* dan tidak terlihat ketika divisualisasikan pada gel agarosa. Amplifikasi *PCR* terdapat DNA yang terlihat jelas dan terang, karena pada saat proses *PCR* berlangsung terjadi amplifikasi fragmen gen 28S rDNA sehingga konsentrasi DNA meningkat. Pada lajur 8 dan 9 pita DNA yang dihasilkan lebih terang dibandingkan lajur 10 yang seharusnya lebih terang, hal ini dikarenakan konsentrasi mempengaruhi intensitas pita DNA yang dihasilkan. Utami *et al.*, (2012) menyatakan bahwa kualitas DNA yang baik memiliki konsentrasi DNA yang tinggi dan juga ditandai dengan tingginya intensitas pita DNA yang dihasilkan. ^[11] munculnya satu pita menunjukkan bahwa pasangan primer yang digunakan bersifat spesifik dan hanya menempel pada posisi yang diharapkan.



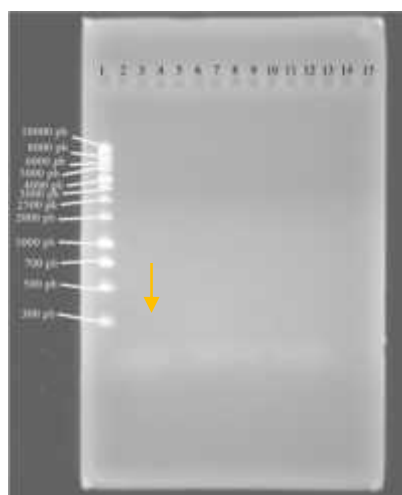
Gambar 4. Hasil elektroforesis DNA. Profil fragmen DNA hasil amplifikasi *PCR* 35 siklus menggunakan primer ITS1 dan ITS4.

Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari amplifikasi dengan menggunakan primer *ITS1* dan *ITS4* sejajar dengan marka penanda DNA yang berada pada ukuran ± 500 pb sesuai dengan target amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa fragmen DNA yang teramplifikasi memiliki ukuran sekitar ± 500 pb.

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekular berbasis *PCR* ialah pemilihan primer dan suhu *annealing* yang tepat amplikon DNA yang tervisualisasikan sebagai pita DNA yang terang dan tebal pada penelitian ini memiliki konsentrasi dan tingkat kemurnian yang tinggi, hal ini ditunjukkan pada sampel dengan metode standar yang memiliki tingkat ketebalan pita DNA yang terang. Pada metode pendinginan di dalam *freezer*-20⁰ C tidak ada sampel DNA yang terdeteksi hal ini dimungkinkan 25 siklus masih terlalu singkat untuk dilakukan amplifikasi *PCR* dengan melisis dinding sel dengan cara fisik menggunakan pendinginan pada *freeze* -20⁰ C (Gambar 5). Begitu juga jika amplifikasi dilakukan dengan 15 siklus *PCR*, tidak ada sampel DNA yang terdeteksi seperti pada Gambar 6.



Gambar 5. Hasil elektroforesis DNA. Profil fragmen DNA hasil amplifikasi PCR 25 siklus menggunakan primer ITS1 dan ITS4.



Gambar 6. Hasil elektroforesis DNA. Profil fragmen DNA hasil amplifikasi PCR 15 siklus menggunakan primer ITS1 dan ITS4.

Menurut ^[12], konsentrasi DNA yang rendah mengindikasikan bahwa DNA masih terkontaminasi oleh protein dan RNA, dimana RNA dan protein sebagai pengotor ikut terekstraksi selama proses isolasi berlangsung, meskipun demikian, pelet DNA ini tetap dapat digunakan untuk amplifikasi *PCR* karena isolat DNA dengan kualitas yang baik tidak menjadi syarat mutlak dalam *PCR*. Pada 15 siklus *PCR* tidak ada sampel yang terdeteksi hanya marka yang terdeteksi, hal ini dimungkinkan 15 siklus juga terlalu singkat sehingga belum bisa digunakan untuk sampel DNA yang diisolasi dengan pendinginan *freezer* -20⁰ C.

4. Kesimpulan

1. DNA *C. tropicalis* dapat diisolasi dengan cara pendinginan berulang di dalam *freezer* pada suhu -20⁰ C yang tertinggi pada lama pendinginan 35 menit dengan konsentrasi DNA 225 µg/mL.
2. Kondisi optimum amplifikasi DNA *C. tropicalis* menggunakan *PCR* dicapai pada 35 siklus *PCR* pada sampel A₃₅, B₃₅ dan C₃₅ dilihat pada pita DNA hasil elektroforesis yang tebal dan terang.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIPA Unsri yang telah mendanai penelitian ini.

Referensi

- [1] Jawetz. (2008). *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : EGC.
- [2] James, S.A and Stratford M. (2003). Spoilage *yeast* with emphasis on the genus. *Woodhead publishing limited Cambridge*. 171-191.
- [3] Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., and Hashimoto, T. (2011). Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 10: 3617-3622.
- [4] Ciardo, G., Luttgen G. And Siminiceanu G. (2001). Strategy for symbolic state space generation. *Construction and analysis of system*. Italy : Springer verlag.
- [5] Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73 : 331–371. *Microbiol Biotechnol*. 43 : 242.
- [6] Retno A. (2008). Metode isolasi DNA. Jakarta : Universitas Indonesia.
- [7] Samaranayake, L.P. (2006) *Essential microbiology for dentistry*. USA : Elsevier limited.
- [8] Hermansyah., Novia., Sugiyama, M. and Harashima S. (2015). *Candida tropicalis* isolated from Tuak, a North Sumatera Indonesian Traditional Beverage, for Bioethanol Production.
- [9] Barnett, J.A., Payne R.W., and Yarrow D. (2000). *Yeast*. Characteristic and identification. *Cambridge University Press*, 9 : 11-39.
- [10] Rapley R. and Heptinstall J. (1998). UV spectrophotometric analysis of ribonucleic acids. *Isolation and characterization protocols*. Totowa : Humana Press Inc.
- [11] Ratnayani, K., Yowani, S.C. and Syane, L. (2009). Amplifikasi framen 0,4 kb daerah D-Loop DNA mitokondria lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan dengan metode *PCR*. *Jurnal Kimia*, 3 : 14-20.
- [12] Ethica, S.M., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, Semiarti, E., Widada, J., and Raharjo, T.J. (2013). Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum sp*. *JG. 3. Indo. J. Chem*, 13 : 248-253.