

**PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI REAL TIME PCR VIRUS
INFLUENZA A ANTARA METODE GUANIDIUM,-THIOCYANATE-PHENOL-
CHLOROFORM DAN METODE SPIN KOLOM**

YUNI YUPIANA

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan Gunung Sindur, Bogor 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan deteksi asam nukleat (RNA) terhadap virus Influenza A dengan menggunakan 15 sampel yang telah dikonfirmasi positif terhadap virus AI subtype H1N1. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan metode ekstraksi pada *real time PCR* untuk menghasilkan RNA optimal dengan membandingkan 2 metode ekstraksi. Pada penelitian ini dilakukan metode *spin* kolom dan metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform* untuk mengkonfirmasi sampel yang sudah diketahui positif terhadap virus Influenza A. Hasil mengindikasikan bahwa kedua metode ini dapat mengkonfirmasi 15 sampel positif. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan metode ekstraksi *spin* kolom diperoleh RNA virus yang lebih banyak dibandingkan dengan metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*.

Kata Kunci: Ekstraksi, PCR, Influenza A

ABSTRACT

Detection of nucleic acid (RNA) from Influenza A virus of 15 samples confirmed positive AI subtype H1N1 has been studied. This study was performed to optimize extraction method of real time PCR in order to get optimal result of RNA by comparing 2 methods of extraction. In this study spin column and Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method were performed to detect RNA of Influenza A virus from confirmed positive samples. The results indicated that both of methods were complied with the previous confirmation for 15 positive samples. From this study we can conclude that using spin column was collected more RNA virus compared to Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method.

Keyword: Extraction, PCR, Influenza A

PENDAHULUAN

Real time RT-PCR (rRT-PCR) merupakan teknologi yang relatif baru yang digunakan untuk mendeteksi *Avian Influenza* (AI) sejak awal tahun 2000 untuk surveilan rutin, selama terjadinya kasus dan untuk tujuan penelitian. Beberapa keuntungan dari rRT-PCR adalah sangat sensitif dan spesifik, cepat dan hasil yang terukur. Selanjutnya rRT-PCR juga dapat digunakan untuk jumlah sampel yang banyak, sedikit lebih murah jika dibandingkan dengan isolasi virus dengan embrio ayam dan karena dalam proses pengerjaannya virus harus diinaktivasi, *biosafety* dan *biosecurity* lebih mudah ditangani (4).

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) sebagai instansi yang memiliki tanggung jawab untuk menjamin obat hewan yang beredar di Indonesia berkomitmen untuk memberi pelayanan yang terbaik dengan mengembangkan metode uji yang lebih akurat dan efisien. Dalam pengujian vaksin AI, BBPMSOH dalam hal ini unit uji virologi melakukan pengujian identitas vaksin AI dengan metode PCR baik konvensional maupun *real time* PCR yang bertujuan mengkonfirmasi subtipe virus AI yang terkandung dalam vaksin AI.

Metode rRT-PCR merupakan metode yang relatif baru sehingga dalam pengerjaannya masih terdapat kendala yang salah satunya adalah jenis sampel seperti misalnya vaksin AI. Vaksin AI tersedia dalam bentuk inaktif dalam *oil adjuvant* yang dapat mengganggu dalam deteksi menggunakan rRT-PCR. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, perlu dilakukan optimalisasi yaitu dengan cara membandingkan dua metode ekstraksi yang tersedia dan banyak digunakan (2,3).

Adapun tujuan dari kajian ini adalah untuk membandingkan dua metode ekstraksi dalam pengujian dengan rRT PCR untuk mendapatkan hasil asam nukelat (RNA) yang lebih optimal.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini setiap metode digunakan 15 sampel. Sampel merupakan isolat virus H1N1 yang sudah dikonfirmasi hasilnya sebagai sampel yang positif virus subtipe ini. Masing-masing sampel yang sama diuji dengan menggunakan 2 metode ekstraksi yang berbeda yaitu metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform* dan metode spin kolom.

Metode Ekstraksi *Guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform*

Isolat virus sejumlah 250 µl ditambahkan ke dalam 750 µl trizol kemudian dicampur sampai homogen lalu diinkubasi pada suhu 25-30 °C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan dengan 200 µl chloroform lalu dihomogenkan dan diinkubasikan pada Rt selama 10 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan 12.000 rpm 2 – 8 °C selama 15 menit. Kemudian 500 µl fase cair dimasukkan ke dalam tabung baru. Setelah itu ditambahkan 500 µl isoprophil alkohol dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Lalu dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm 2 – 8 °C selama 10 menit dan supernatan dibuang. Diambil sedimen RNA dan ditambahkan 1000 µl ethanol 75% lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit. RNA dikeringkan selama 7 menit pada *laminar air flow*. Kemudian 10 µl RNA dilarutkan dalam air bebas RNase, diinkubasi

dalam penangas air 60 °C selama 10 menit dan disimpan pada -20 °C. Selanjutnya RNA diubah menjadi DNA dan dideteksi dengan Realtime PCR.

Metode Ekstraksi *Spin Kolom*

Pipet 560 µl Buffer (AVL) yang mengandung *carrier* RNA lalu ditambahkan dengan 140 µl isolat virus kemudian divorteks selama 15 detik. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Disentrifugasi 15 detik untuk menghilangkan tetesan air pada tutup. Kemudian dilakukan penambahan 560 µl ethanol (96-100%) ke dalam sampel kemudian di vorteks selama 15 detik. Lalu dimasukkan 630 µl larutan tersebut ke dalam *QIAamp Mini spin column* (tabung koleksi 2 ml dari Qiagen) tanpa membasahi rim (daerah di sekitar tutup tabung). Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Filtrat dibuang dan *QIAamp Mini spin column* dimasukkan ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru. Langkah ini diulangi sekali lagi lalu tambahkan 500 µl Buffer AW1. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Filtrat dibuang dan *QIAamp Mini spin column* dimasukkan ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru. Secara hati-hati *QIAamp Mini spin column* dibuka dan ditambahkan 500 µl Buffer AW2. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan tinggi yaitu 20.000 x g; 14.000 rpm selama 3 menit, lalu langkah ini diulangi. Kemudian ditambahkan 60 µl of Buffer AVE diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Selanjutnya RNA diproses dengan langkah *reverse transcriptase* untuk mengubah RNA menjadi DNA lalu dideteksi dengan r-RT PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Ekstraksi r-RT PCR Virus Influenza dengan metode *Guanidium thiocyanate-phenol-chloroform* dan spin kolom

No.	CT (<i>Cycle Treshold</i>)	
	Spin kolom	<i>Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform</i>
1	21,81	22,3
2	21,71	26,53
3	19,98	26,81
4	20,54	22,49
5	20,37	22,36
6	20,67	27,44
7	21,22	27
8	20,92	27,75
9	21,43	22,32
10	21,72	22,55
11	21,62	22,83
12	21,64	22,45
13	20,95	22,63
14	21,53	22,92
15	21,78	21,56
	Nilai rata-rata = 21,19	Nilai rata-rata = 24,00
	P- Value = 0,00092	

Tabel di atas menunjukkan bahwa 15 sampel yang diuji dengan menggunakan kedua metode diperoleh hasil semua sampel positif terhadap Influenza A. Namun demikian berbeda dalam nilai CT (*cycle threshold*).

Pengujian realtime PCR, reaksi positif dapat dideteksi dengan adanya akumulasi signal fluoresen. CT (*cycle threshold*) didefinisikan sebagai jumlah siklus yang dibutuhkan untuk mendapatkan *signal* fluoresen yang melintasi *threshold*. Nilai CT berbanding terbalik dengan jumlah asam nukleat yang terkandung dalam sampel sehingga dapat diartikan bahwa semakin rendah CT semakin banyak jumlah asam nukleat (1). Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai rata-rata CT yang diperoleh dengan metode spin kolom lebih kecil dibanding dengan metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*. Hal ini berarti bahwa jumlah asam nukleat yang berhasil diperoleh dengan metode spin kolom lebih banyak daripada dengan metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*.

Metode ekstraksi *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction* bekerja dengan menjaga integritas RNA selama homogenisasi jaringan, tetapi dalam waktu yang sama merusak dan melepaskan ikatan sel dan komponen-komponennya. Metode ini melibatkan prosedur yang lebih rumit terutama pada saat koleksi RNA sehingga besar kemungkinan pada langkah ini RNA ikut terbuang. Sementara pada metode spin kolom digunakan buffer AVL yang memiliki fungsi yang sama dengan *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform* namun perbedaan hasil kemungkinan disebabkan karena metode *spin* kolom yang lebih sederhana.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan metode spin kolom dapat menghasilkan asam nukleat yang lebih banyak dibandingkan dengan metode *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*, dan metode pada spin kolom lebih sederhana. Dari hasil penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui faktor lain yang mengakibatkan perbedaan jumlah asam nukleat yang diperoleh dari kedua metode ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Annonimus.**2011.Real-time PCR: Understanding CT. Available at http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/geralddocuments/cms_053906.pdf..: 1. Diunduh pada 5 Maret 2011.
2. **Chomczynski P, Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol.chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.
3. **Kolodziejek J. and Nowotny N.** 2002. Comparison of PCR Kleen™ Spin Columns to Traditional Methods for Purification of PCR Products Prior to Sequencing, *Rev A. Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Vienna , Veterinaerplatz 1, A – 1210 Vienna, Austria.*: 1.
4. **Spackman, E.** 2007. Avian influenza virus. Humana Press, Athens, Georgia : 19.