

Konsentrasi dan kemurnian ekstraksi DNA metode sonikasi dan *spin column* pada sampel dahak penderita tuberkulosis

(Concentration and purity of DNA extraction with sonication and *spin column* methods in the sputum sample of tuberculosis patient)

Fitrianingsih Saputra^{1*}, Asep Iin Nur Indra², Ai Djuminar², Fusvita Merdekawati², Betty Nurhayati²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medik, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Bandung, Indonesia

²Bidang Biologi Molekuler, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Bandung, Indonesia

Diterima: 11 Februari 2024 | Direvisi: 23 April 2024 | Disetujui: 24 April 2024

Terbit daring: 15 Juni 2024

Abstrak

Metode *polymerase chain reaction* (PCR) dapat digunakan untuk mengidentifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dalam sampel dahak (sputum) penderita tuberkulosis (TBC). Salah satu langkah penting untuk memastikan hasil PCR yang akurat adalah proses ekstraksi DNA. Penelitian bertujuan untuk membandingkan konsentrasi dan kemurnian DNA pada dahak penderita TBC menggunakan teknik ekstraksi sonikasi dan *spin column*. Penelitian menggunakan desain studi deskriptif dengan strategi *post-only design*. Data yang digunakan merupakan data primer yang berasal dari 18 sampel dahak penderita TBC. Pengukuran konsentrasi dan pengujian kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer *nanodrop*. Ekstraksi DNA dengan metode sonikasi memiliki konsentrasi rata-rata $18,9 \pm 8,5$ ng/ μ L, dengan konsentrasi tertinggi 37,6 ng/ μ L. Ekstraksi DNA metode *spin column* menghasilkan konsentrasi rata-rata $55,5 \pm 27,9$ ng/ μ L, dengan konsentrasi tertinggi 105,0 ng/ μ L. Nilai kemurnian ekstraksi DNA yang berada di rentang 1,8–2,0 pada metode sonikasi sebanyak 11/18 (61%) sampel dan pada metode *spin column* sebanyak 14/18 (78%) sampel. Dapat disimpulkan bahwa metode sonikasi memiliki rata-rata konsentrasi dan nilai kemurnian yang lebih rendah dibandingkan dengan metode *spin column*, dan terdapat perbedaan dalam konsentrasi dan nilai kemurnian pada kedua metode tersebut.

Kata kunci: konsentrasi DNA | kemurnian DNA | dahak penderita tuberkulosis | sonikasi | *spin column*

Abstract

The Polymerase Chain Reaction (PCR) method can identify *Mycobacterium tuberculosis* in a sputum sample of a patient with tuberculosis (TB). One crucial step to ensure accurate PCR results is the DNA extraction process. The research aimed to compare the concentration and purity of DNA from the sputum of TB patients using ultrasound and spin column extraction techniques. The research uses descriptive study designs with post-only design strategies. The primary data were derived from 18 sputum specimens from TB patients. Concentration measurement and DNA purity testing using a nanodrop spectroscopic photometer. DNA extraction by ultrasound method had an average concentration of 18.9 ± 8.5 ng/ μ L, with a peak of 37.6 ng/ μ L. The spin column method produced an average of 55.5 ± 27.9 ng/ μ L, with a peak of 105.0 ng/ μ L. The purity value of the DNA extract was in the range of 1.8 ± 2.0 with the ultrasound method of 11/18 (61%) samples and the spin column method of 14/18 (78%) samples. In conclusion, the sonication method has a lower average concentration and a higher percentage of purity than the spin column method, and there are differences in concentrations and purity values between the two methods.

Keywords: DNA concentration | DNA purity | tuberculosis sputum | sonication | spin column

* Penulis korespondensi: E-mail: fitrianingsih.fs@gmail.com.

© The Author(s) 2024. This article is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, and indicate if changes were made.

Pendahuluan

Tuberkulosis (TBC) disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan masih menjadi penyakit yang menyumbang angka kematian yang tinggi di dunia. Indonesia menempati peringkat ketiga setelah India dan Cina dengan jumlah kasus 824 ribu dan 93 ribu kematian dalam setahun (Kemenkes, 2022).

Proses ekstraksi DNA adalah salah satu langkah terpenting untuk memastikan hasil yang akurat, konsisten, dan sukses dalam teknik PCR. Proses tersebut menandai titik awal dalam setiap kit diagnostik molekuler. Penggunaan teknik ekstraksi DNA harus mengarah pada ekstraksi yang efisien dengan kuantitas dan kualitas DNA yang baik, murni, dan bebas dari kontaminan, seperti RNA dan protein (Ali *et al.*, 2017; Candani *et al.*, 2018). Berbagai metode ekstraksi DNA pada pelaksanaannya dapat menghasilkan perbedaan sensitivitas dan spesifisitas dalam penggunaan teknik PCR. Variabilitas ini disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah protokol ekstraksi DNA yang diterapkan. Metode ekstraksi DNA harus menghasilkan kualitas DNA yang baik, menghilangkan gangguan pada saat proses PCR, dapat diterapkan dalam praktik laboratorium, menghasilkan sampel berkualitas baik untuk analisis molekuler lanjutan, namun tetap sederhana dan cepat (de Almeida *et al.*, 2013).

Ekstraksi DNA dapat dibagi menjadi metode kimia, metode mekanik, dan metode fase padat (Ali *et al.*, 2017; Shin, 2013). Metode sonikasi menggunakan energi suara pada 20 KHz–10 MHz dilakukan untuk pengadukan partikel dalam sampel dalam proses seperti ekstraksi (Candani *et al.*, 2018). Meskipun telah digunakan di beberapa laboratorium, metode sonikasi masih menyimpan keraguan tentang efektivitas DNA yang diekstrak langsung dari sampel dahak (sputum) untuk tujuan penggunaan PCR. Keraguan muncul karena dalam proses sonikasi tidak dilakukan purifikasi (Bello *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2016; Rabodoarivelo *et al.*, 2016). Ekstraksi DNA dari sampel dahak dengan metode sonikasi menghasilkan nilai konsentrasi DNA *M. tuberculosis* yang lebih tinggi dibandingkan

dengan kit komersial metode silika resin, tetapi memiliki nilai kemurnian yang lebih rendah dari kit komersial metode silika resin (Bello *et al.*, 2020). Sonikasi yang dilakukan pada frekuensi 40 KHz dan suhu ruang, efektif mengekstraksi DNA untuk amplifikasi PCR pada beberapa jenis bakteri gram positif, seperti *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, dan *Listeria monocytogenes* (Bello *et al.*, 2020; Chen & Yuan, 2023).

Teknik *spin column* merupakan metode ekstraksi fase padat yang menggunakan membran silika untuk mengisolasi asam nukleat dari berbagai sampel biologis, seperti serum, plasma, cairan tubuh, dan dahak (Putu & Dewi, 2019; Sundari & Priadi, 2019). Proses *spin column* terdiri atas penghancuran sel, pemurnian, pencucian, *binding*, dan elusi dengan pencucian yang sesuai (Putu & Dewi, 2019). *Spin column* merupakan suatu teknik ekstraksi yang efisien dan telah banyak tersedia secara komersial. Metode ini memungkinkan ekstraksi dapat dilakukan dengan cepat dan efisien dibandingkan dengan metode lain, seperti GuSCN-phenol-chloroform, CsCl, dan EtBr (Tan & Yiap, 2009). Kelemahan teknik ini adalah tidak dapat memulihkan fragmen DNA kecil secara efisien karena fragmen kecil berikatan erat dengan matriks silika (Ali *et al.*, 2017). Hasil penelitian Kumalasari *et al.* (2020) menunjukkan metode *spin column* memiliki hasil limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) yang lebih baik daripada hasil LoD dan LoQ metode *boiling* dalam mengidentifikasi *S. aureus* (Kumalasari *et al.*, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan konsentrasi dan nilai kemurnian metode sonikasi dan *spin column* pada ekstraksi DNA asal dahak untuk mendeteksi *M. tuberculosis*.

Metode

Etik dan desain penelitian

Penelitian ini sudah dinyatakan layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung dengan nomor layak etik No.48/KEPK/EC/XII/23. Penelitian menggunakan metode deskriptif dengan membandingkan nilai

konsentrasi dan kemurnian hasil ekstraksi DNA menggunakan metode sonikasi dan *spin column*, dengan *Post-only Design*. Penelitian menggunakan 10 sampel dahak yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat (Labkesprov Jabar) dan 8 sampel yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Daerah Kab. Bandung Barat (Labkes KBB).

Ekstraksi DNA dengan metode sonikasi

Sonikasi menggunakan alat EECO 120W-MH-020S (RoHS, Cina). Cara kerja, lama waktu sonikasi, serta jenis sonikator yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada penelitian Bello *et al.* (2020), yaitu selama 15 menit dengan sonikator tipe *sonicator bath*. Modifikasi frekuensi menggunakan 40 khz merujuk penelitian Chen & Yuan (2023) dan suhu yang digunakan adalah suhu ruang.

Sebanyak 200 μ L sampel dahak didekontaminasi dengan 200 μ L natrium hidroksida (NaOH) 4% (perbandingan 1:1). Sampel dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL dan dilakukan homogenisasi dengan vortex. Selanjutnya, sampel diinkubasi di penangas air pada suhu 37°C selama 15 menit dan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 g, lalu supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dalam 200 μ L larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) pH 7,4 dan dihomogenisasi dengan vortex. Sampel yang sudah diresuspensi dalam buffer PBS dimasukkan ke dalam waterbath 95°C selama 20 menit. Suhu pada alat *sonicator bath* diatur pada suhu 22°C dengan waktu 15 menit. Setelah dilakukan sonikasi, sampel disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 g. Suspensi (supernatan) yang mengandung DNA dikoleksi dan sebanyak 10 μ L DNA dipisahkan untuk tujuan pemeriksaan konsentrasi dan kemurnian.

Ekstraksi DNA dengan metode *spin column*

Ekstraksi DNA dengan metode *spin column* menggunakan kit komersial (*Viral Nucleic Acid Extraction Kit II*, Geneaid, Taiwan) dengan membran silika yang secara efisien dapat dioptimalkan untuk pemurnian DNA virus dari sampel cairan tubuh.

Kit ini dapat memurnikan sampel hingga 200 μ L sampel dalam waktu 20 menit dan hasil ekstraksi dapat langsung digunakan dalam pengujian *real time* PCR. Sebanyak 200 μ L sampel dahak didekontaminasi dengan 200 μ L natrium hidroksida (NaOH) 4% (perbandingan 1:1) dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Campuran tersebut dihomogenisasi dengan vortex, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000–16.000 g selama 2 menit, lalu supernatannya dibuang.

Sebanyak 400 μ L *VB lysis buffer* ditambahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang berisi endapan (*pellet*) sampel. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vortex, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, ditambahkan 450 μ L *AD buffer*, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran lisat sebanyak 600 μ L dipindahkan ke dalam *VB column* yang telah ditempatkan di atas *collection tube*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000–16.000 g selama 1 menit. Cairan yang ada di *collection tube* dibuang, lalu *VB column* dipasang kembali. Penambahan 400 μ L *W1 Buffer* dilakukan ke dalam *VB column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000–16.000 g selama 30 detik. Cairan yang ada di *collection tube* dibuang, lalu *VB column* disimpan kembali ke *collection tube*. Sebanyak 600 μ L *wash buffer* ditambahkan ke *VB Column*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000–16.000 g selama 3 menit. Cairan yang ada di *collection tube* dibuang, lalu *VB column* dimasukkan kembali ke *collection tube*. *VB column* dipindahkan ke tabung mikro dan ditambahkan 50 μ L *RNAse-free water*. Tabung mikro didiamkan selama minimal 3 menit kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 15.000 g (Geneaid, 2020). Suspensi DNA yang telah terkumpul di tabung mikro dipisahkan sebanyak 10 μ L untuk tujuan pemeriksaan konsentrasi dan kemurnian.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian dilakukan dengan spektrofotometer *nanodrop* (Nanophotometer NP80, Implen, Jerman).

Persiapan alat dimulai dengan memilih menu “*nucleic acid*”, lalu bagian cahaya nanodrop dibilas menggunakan cairan NFW (*Nuclease Free Water*). Sebanyak 3 μ L NFW dimasukkan ke dalam bagian cahaya nanodrop dan ditekan “*blank*” untuk mengukur *blanko/baseline*. Sampel dimasukkan ke dalam bagian cahaya nanodrop sebanyak 3 μ L dan ditekan menu “*sample*”. Setiap sample yang dimasukkan dipastikan terlebih dahulu bagian cahaya nanodrop dibilas menggunakan NFW (*NanoPhotometer user manual*).

Real time PCR

Deteksi *M. tuberculosis* menggunakan metode *Real Time PCR* (*Kit Promega GoTaq qPCR Master Mix*). Dikarenakan keterbatasan penelitian, deteksi PCR dilakukan sebanyak 6 sampel pada masing-masing metode. Deteksi dilakukan hanya untuk melihat bahwa kedua metode dapat menghasilkan *template* DNA yang dapat dideteksi oleh PCR dengan dibuktikan adanya kurva dan nilai Ct.

Larutan *mastermix* disiapkan dengan cara mencampurkan *GoTaq[®] qPCR, primer PCR*, dan *Nuclease free water* dengan total volume per reaksi sebanyak 20 μ L. Kemudian, masing-masing 20 μ L *reagen mix* dipipet dan dimasukkan ke dalam *PCR tube*. Selanjutnya, *template* DNA ditambahkan sebanyak 5 μ L ke dalam *PCR tube* yang berisi *reagen mix*. Amplifikasi diawali dengan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit dalam 1 siklus. Selanjutnya, dilakukan proses denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, annealing pada suhu 60°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 60°C selama 1 menit dan masing-masing dilakukan sebanyak 40 siklus. Pada tahap akhir, *cooling* dilakukan pada suhu 35°C selama 30 detik sebanyak 1 siklus.

Analisis data

Data konsentrasi dan kemurnian diuji statistik normalitas untuk melihat distribusi data. Selanjutnya, data diuji statistik komparatif

nonparametrik menggunakan uji Wilcoxon dengan software SPSS 25.

Hasil

Data hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi disajikan pada **Tabel 1**. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi metode sonikasi memiliki rata-rata 18,9 \pm 8,5 ng/ μ L untuk metode sonikasi dan 55,5 \pm 27,9 ng/ μ L untuk metode *spin column*. Sampel memiliki kemurnian DNA yang baik jika nilai kemurnian berada di rentang 1,8–2,0. Jumlah sampel dengan kemurnian DNA 1,8–2,0 ialah sebanyak 11/18 (61%) sampel untuk metode sonikasi dan 14/18 (78%) sampel untuk metode *spin column*. Hasil uji Wilcoxon menghasilkan nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* <0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi dan nilai kemurnian DNA antara metode sonikasi dan *spin column*.

Kurva hasil amplifikasi *real time PCR* dapat ditunjukkan pada **Gambar 1** dan nilai Ct kedua metode ditunjukkan pada **Tabel 2**. Dari 6 sampel yang diperiksa dengan *real time PCR* terdapat 1 sampel yang memiliki kurva dan nilai Ct pada metode sonikasi (**Gambar 1.A** dan **Tabel 2**) dan semua sampel menunjukkan kurva dan nilai Ct pada metode *spin column* (**Gambar 1.B** dan **Tabel 2**).

Pembahasan

Proses ekstraksi dengan metode sonikasi dan *spin column* diawali dengan dekontaminasi dahak dengan NaOH 4%. Dekontaminasi dahak berfungsi untuk homogenisasi dahak agar *M. tuberculosis* yang terperangkap akan lepas dari jaringan dahak. Selain itu, larutan ini juga berfungsi untuk membunuh semua organisme lain yang ada pada dahak, kecuali *M. tuberculosis* (Burdz et al., 2003).

Pada metode sonikasi, proses pembentukan gelembung-gelembung yang terjadi akan menghasilkan tekanan, suhu, dan gaya geser yang tinggi sehingga dapat memecah partikel, sel, atau molekul dalam dahak. Sel-sel yang pecah akan

Tabel 1 Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dengan metode sonifikasi dan *spin column* pada sampel dahak penderita tuberculosis

No. sampel	Konsentrasi DNA (ng/μL)		Kemurnian DNA (A260/A280)	
	Metode sonikasi	Metode <i>spin column</i>	Metode sonikasi	Metode <i>spin column</i>
1	21,9	64,5	1,9	1,8
2	20,0	70,5	1,9	1,8
3	19,7	65,0	2,1	1,8
4	21,4	70,8	2,0	1,8
5	22,1	71,0	1,9	1,8
6	21,1	64,8	1,9	1,8
7	37,6	65,4	1,7	1,8
8	19,9	71,0	1,9	1,8
9	20,0	65,5	2,0	1,8
10	37,0	66,8	1,8	1,9
11	10,2	20,6	2,4	1,8
12	11,4	20,8	2,0	1,6
13	6,3	21,2	2,6	1,8
14	10,2	105,0	1,6	1,8
15	12,0	97,0	1,7	1,7
16	9,6	20,2	1,8	1,7
17	21,2	19,2	1,8	1,8
18	17,7	18,9	1,7	1,7
Sampel dengan kemurnian 1,8–2,0			11/18 (61%)	14/18 (78%)
Rata-rata ± sd	18,9 ± 8,5	55,5 ± 27,9	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,06
Uji Wilcoxon*				
Nilai Z		-3,636		-2,612
<i>Asymp. Sig. (2-tailed)</i>		0,000		0,009

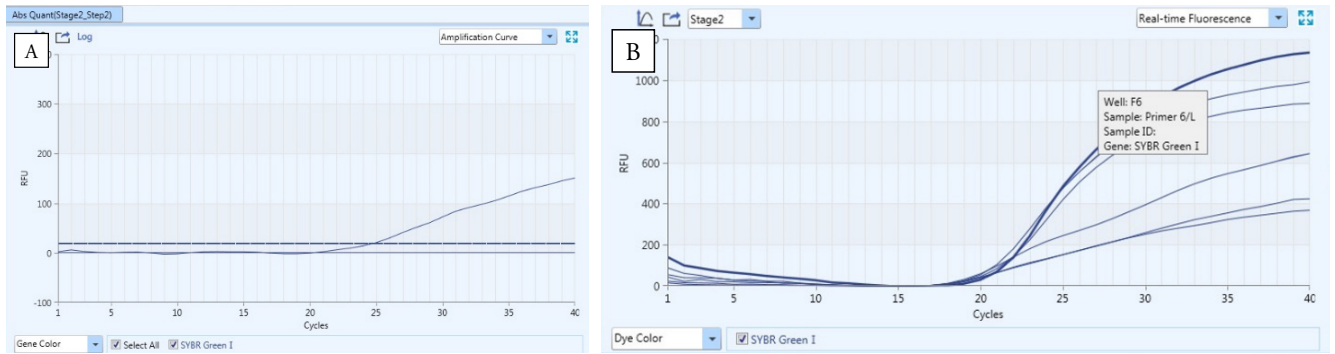
* Uji Wilcoxon menunjukkan terdapat perbedaan konsentrasi dan nilai kemurnian DNA antara metode sonikasi dan *spin column* dengan *Asymp. Sig. (2-tailed)* <0,05.

melepaskan isinya ke dalam larutan di sekitarnya. Selanjutnya, proses pemisahan DNA *M. tuberculosis* yang dilakukan dengan sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 g menyebabkan pengendapan protein, lipid, dan komponen yang lain, tetapi tidak DNA sehingga memungkinkan DNA terkonsentrasi di dalam supernatan.

Ekstraksi DNA dengan metode *spin column* pada penelitian ini diperuntukkan untuk pemurnian DNA dari sampel seperti serum, plasma, cairan tubuh, dan kultur sel. Fase padat yang digunakan adalah membran silika yang berfungsi untuk mengikat asam nukleat. Penambahan reagen *VB lysis buffer* dan *AD buffer* berfungsi untuk melisiskan dinding *M. tuberculosis* sehingga memungkinkan

pelepasan komponen seluler. *Lysis buffer* juga berperan memecah jaringan, merusak membran sel, dan menghilangkan kontaminan. Untuk dapat menghilangkan sisa buffer sebelumnya dan sisa protein yang mungkin menempel pada DNA, maka dilakukan penambahan *W1 buffer* dan *Wash buffer* (Afnan Uda *et al.*, 2020).

Sentrifugasi dilakukan setiap kali dilakukan penambahan reagen. Sentrifugasi berfungsi untuk membantu pengikatan DNA ke matriks silika sehingga komponen seluler selain DNA dapat mengalir ke dasar *collection tube*. Proses elusi menggunakan larutan *RNAse-free water* merupakan langkah akhir ekstraksi dengan metode *spin column*. Proses elusi menyebabkan pelepasan ikatan antara



Gambar 1 Kurva amplifikasi real time PCR menggunakan enam sampel DNA hasil ekstraksi dengan metode sonikasi (A) dan *spin column* (B). Hanya satu sampel yang menunjukkan kurva dan memiliki nilai Ct pada metode sonikasi dibandingkan dengan semua enam sampel menunjukkan kurva dan nilai Ct pada metode ekstraksi *spin column*.

Tabel 2 Nilai CT pada metode sonikasi dan *spin column*

No. Sampel	Nilai CT	
	Metode sonikasi	Metode <i>spin column</i>
1	-	20,395
2	-	20,426
3	-	19,895
4	-	19,863
5	-	19,270
6	24,824	20,090

fosfat DNA (muatan negatif) dengan silika (muatan positif) menggunakan larutan dengan pH yang tinggi dan kandungan garam yang rendah. Dengan demikian, ekstrak DNA yang menempel pada kolom dapat dibuang keluar dari kolom (Chauhan, 2022; Gautam, 2022).

Nilai konsentrasi DNA *M. tuberculosis* metode sonikasi (18,9 ng/ μ L) yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai yang didapatkan dengan metode *spin column* (55,5 ng/ μ L) menunjukkan hasil yang berbeda dari penelitian sebelumnya. Bello et al. (2020) mendapatkan hasil ekstraksi DNA dari sampel dahak yang diberi perlakuan sonikasi selama 15 menit memiliki nilai konsentrasi DNA yang lebih tinggi (37.01 ± 36.91 ng/ μ L) dibandingkan dengan kit komersial metode silika resin. Perbedaan ini dapat terjadi dikarenakan perbedaan pada besaran frekuensi dan suhu yang digunakan yang mengacu pada penelitian yang berbeda (Chen & Yuan (2023).

Faktor yang memengaruhi proses ekstraksi

dengan metode sonikasi, di antaranya adalah suhu, frekuensi, dan lama waktu sonikasi. Fenomena kavitasi (peronggaan) pada metode sonikasi terjadi akibat gelombang suara dengan frekuensi tinggi yang disebut ultrasonikasi. Jika intensitas gelombang ultrasonik di dalam air terus ditingkatkan, maka akan dicapai suatu kondisi maksimum di mana gaya antarmolekul tidak dapat lagi menahan struktur molekul seperti pada keadaan awal. Akibatnya, molekul ini akan pecah dan terbentuklah rongga (*cavity*) sehingga sel dapat mengeluarkan komponen yang ada di dalamnya. Makin tinggi frekuensi, maka akan makin sulit untuk membentuk gelembung kavitasi. Ketika frekuensi yang diberikan pada saat ekstraksi tidak optimal, maka proses pembentukan rongga akan terhambat sehingga DNA tidak dapat keluar dari dalam sel secara maksimal dan konsentrasi DNA yang diperoleh akan menjadi lebih sedikit (Sambrook & Russell, 2006).

Suhu memengaruhi proses sonikasi. Makin tinggi suhu sonikasi, maka makin menurun produk hasil sonikasi. Kenaikan suhu mengakibatkan peningkatan tekanan uap molekul pelarut dalam kavitasi *micro-bubble* sehingga menurunkan intensitas kavitasi akibat kontak antara *micro-bubble* dan matriks yang makin berkurang (Greenly & Tester, 2015).

Kemurnian DNA diukur dengan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan kemurnian DNA yang baik adalah 1,8–2,0.

Nilai kemurnian DNA dengan kisaran rasio tersebut berarti telah memenuhi persyaratan kemurnian yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Bello *et al.*, 2020; Mukae *et al.*, 2023).

Pada penelitian ini, jumlah sampel dengan rentang kemurnian DNA yang baik (1,8–2,0) lebih banyak pada *spin column* (78% sampel) dari pada metode sonikasi (61% sampel). Hasil ini sesuai dengan penelitian Bello *et al.* (2020) bahwa metode sonikasi memiliki nilai kemurnian yang lebih rendah dibandingkan hasil dari kit komersial metode silika resin.

Penyebab nilai kemurnian pada metode sonikasi lebih rendah karena tidak ada proses pencucian dan purifikasi pada metode ini sehingga ekstrak DNA masih tercampur dengan komponen lain. Tanpa proses pencucian dan purifikasi tersebut, pembacaan alat pada panjang gelombang 280 nm menjadi lebih besar, rasio absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm akan menurun, dan nilai kemurnian menjadi di bawah 1,8. Penurunan nilai kemurnian di bawah 1,8 menunjukkan terjadi kontaminasi oleh protein pada hasil ekstraksi DNA (Boesenberg-Smith *et al.*, 2012).

Terdapat tiga sampel pada metode sonikasi yang memiliki nilai kemurnian di atas 2,0. Nilai kemurnian di atas 2,0 diperoleh dari absorbansi yang tinggi pada panjang gelombang 260 nm. Hal tersebut dikarenakan bukan hanya DNA saja yang mampu menyerap sinar UV pada 260 nm, tetapi RNA juga memiliki daya serap yang besar pada panjang gelombang 260 nm. Keberadaan RNA bisa disebut sebagai kontaminan jika berada dalam larutan DNA (Lee *et al.*, 2018). Oleh karena itu, proses purifikasi menjadi penting agar hasil ekstraksi yang didapat menjadi lebih murni.

Metode ekstraksi *spin column* memiliki empat sampel dengan nilai kemurnian di bawah 1,8. Nilai kemurnian di bawah 1,8 tersebut dapat disebabkan karena kesalahan pada saat proses lisis. Proses lisis dan degradasi protein yang tidak sempurna dapat menyebabkan ekstraksi DNA menjadi tidak layak

karena dapat berpengaruh pada pengikatan DNA dan proses pencucian. Kontaminan yang ikut terbangun karena masih menempel pada DNA dan dapat tercampur selama proses selanjutnya sehingga akan berpengaruh pada nilai kemurnian sampel. Selama proses elusi, larutan elusi RNase free water harus benar-benar dipastikan telah ditambahkan ke bagian tengah matriks kolom dan harus dibiarkan menyerap ke dalam membran sebelum dilakukan sentrifugasi (Febriyanti *et al.*, 2023). Memastikan proses ini akan memastikan DNA yang terikat di matriks kolom benar-benar telah terelusi dengan sempurna dan meningkatkan konsentrasi DNA hasil ekstraksi.

Simpulan

Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi dan nilai kemurnian antara metode sonikasi dan *spin column*. Metode sonikasi memiliki rata-rata konsentrasi dan nilai kemurnian lebih rendah dibandingkan dengan metode *spin column*.

Ucapan terima kasih: Penulis mengucapkan terima kasih kepada Aditya Juliastuti, S.Tr.Kes sebagai laboran di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Pendanaan: Tidak ada

Konflik kepentingan: Semua penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini.

Kontribusi penulis: FSA dan AINI merancang penelitian, FSA melaksanakan penelitian dan menulis naskah penelitian, AINI sebagai supervisi dalam penelitian, AD membantu dalam menganalisis hasil penelitian dan metodologi penulisan, FM menyusun metodologi penelitian dan memberikan masukan dalam proses penelitian, BN membantu validasi hasil penelitian.

Referensi

Afnan Uda MN, Parmin NA, Jambek AB, Hashim U, Uda MNA, Shahrudin SNA. 2020. Evaluation and optimization of genomic dna extraction from food sample for microfluidic

- purpose. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 743(1): 012031. DOI: 10.1088/1757-899X/743/1/012031.
- Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. 2017. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed Research International*, 2017:9 306564. DOI: 10.1155/2017/9306564.
- Bello GL, Morais FCL, Wolf JM, Gehlen M, Soares TDS, Halon ML, Barcellos RB, Rossetti MLR. 2020. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in sputum using DNA extracted by sonication. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(5): 398–404. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.08.006.
- Boesenberg-Smith KA, Pessaraki MM, Wolk DM. 2012. Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1): 1–6. DOI: 10.1016/J.CLINMICNEWS.2011.12.002.
- Burdz TVN, Wolfe J, Kabani A. 2003. Evaluation of sputum decontamination methods for *Mycobacterium tuberculosis* using viable colony counts and flow cytometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(3): 503–509. DOI: 10.1016/S0732-8893(03)00138-X.
- Candani D, Ulfah M, Noviana W, Zainul R. 2018. *Pemanfaatan teknologi sonikasi*. DOI: 10.31227/osf.io/uxknv.
- Chauhan T. 2023. Advantages and limitations of spin column DNA extraction technique – genetic education. Link: <https://geneticeducation.co.in/advantages-and-limitations-of-spin-column-dna-extraction-technique/>. Download: 14 Agustus 2023.
- Chen N, Yuan X. 2023. A quick DNA extraction method for high throughput screening in gram-positive bacteria. *Bio-protocol*, 13(8): e4653. DOI: 10.21769/BioProtoc.4653.
- Dai X, Chen S, Li N, Yan H. 2016. Quantitative and qualitative validations of a sonication-based DNA extraction approach for PCR-based molecular biological analyses. *Analytical Biochemistry*, 501, 44–46. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.003.
- De Almeida IN, Da Silva Carvalho W, Rossetti ML, Costa ER, De Miranda SS. 2013. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study. *BMC Research Notes*, 6: 561. DOI: 10.1186/1756-0500-6-561.
- Febriyanti I, Djuminar A, Merdekawati F, Indra AIN. 2023. Comparison of purity and concentration values of *Mycobacterium tuberculosis* DNA extraction result from the boiling and spin column method. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 5(2): 133–145. DOI: 10.33086/ijmlst.v5i2.4771.
- Gautam A. 2022. Spin column-based isolation of nucleic acid. In: *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. Springer, Cham. Pp. 47–53. DOI: 10.1007/978-3-030-94230-4_5.
- Geneaid. 2020. Viral nucleic acid extraction kit II. Ver. 05/07/20. Link: <https://www.geneaid.com/data/files/1605784536384970482.pdf>. Download: 16 November 2023
- Greenly JM, Tester JW. 2015. Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. *Bioresour Technol*, 184: 276–279. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2014.11.036.
- Kemkes (Kementrian Republik Indonesia). 2022. Profil kesehatan Indonesia. Link: <https://kemkes.go.id/id/profil-kesehatan-indonesia-2022>. Downlod: 5 April 2023.
- Kumalasari RD, Risandiansyah R, Fadli Z. 2020. Perbandingan metode isolasi DNA filter based kit dengan *heat treatment* berdasarkan *limit of detection* dan *quantification* pada *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kedokteran Komunitas*, 8(2): 101–108.
- Lee DE, Lee H, Lee SD, Han HS, Choe JY, Yun S, Park HJ, Park J, Kim JK. 2018. Comparison of different methods of RNA preparation from

- peripheral blood for nucleic acid amplification assay. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 36(1): 77–82. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_18_104.
- Mukae K, Takei O, Imai F, Kamijo T. 2023. Development of RNA/DNA automated extraction and purification device for infectious disease diagnosis. *Practical Laboratory Medicine*, 37: e00335. DOI: 10.1016/j.plabm.2023.e00335.
- Putu L, Dewi K. 2019. Pemeriksaan basil tahan asam untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit tuberkulosis. *International Journal of Applied Chemistry Research*, 1(1): 2541–7207. DOI: 10.23887/ijacr-undiksha.
- Rabodoarivelo MS, Aerts M, Vandamme P, Palomino JC, Rasolofo V, Martin A. 2016. Optimizing of a protein extraction method for *Mycobacterium tuberculosis* proteome analysis using mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 131: 144–147. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.10.021.
- Sambrook J, Russell DW. 2006. Fragmentation of DNA by sonication. *CSH Protocols*, 2006(4): pdb.prot4538. DOI: 10.1101/pdb.prot4538.
- Shin JH. 2013. Nucleic acid extraction techniques. In: Tang YW, Stratton C (eds). *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. Boston, MA (US): Springer. DOI: 10.1007/978-1-4614-3970-7_11.
- Sundari S, Priadi B. 2019. Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2): 87–90.
- Tan SC, Yiap BC. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009: 574398. DOI: 10.1155/2009/574398.