

OPTIMASI VOLUME TEMPLAT DNA DAN JUMLAH SIKLUS AMPLIFIKASI UNTUK DETEKSI *Wuchereria bancrofti* METODE *REAL-TIME* PCR

Safanah, Anisa^{1*)}; Djuminar, Ai¹; Merdekawati, Fusvita¹; Kurniawan, Entuy¹;
Ernawati¹

^{1*)} Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung,
e-mail : anisasafanah@gmail.com

ABSTRAK

Filariasis yang disebabkan oleh *Wuchereria bancrofti* masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Pemeriksaan mikroskopis darah sebagai *gold standard* memiliki beberapa kelemahan, sehingga diagnosis klinis berbasis Biologi Molekuler mulai dikembangkan, khususnya metode *Real-Time* PCR. Pada penelitian ini untuk mencapai hasil terbaik dilakukan optimasi terhadap volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui berapa volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi yang optimum untuk deteksi *Wuchereria bancrofti* dengan menggunakan metode *Real-Time* PCR. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen semu. Desain penelitian yang dilakukan yaitu dibuat matriks terhadap volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi yaitu 2;30, 3;30, 4;30, 2;35, 3;35, 4;35, 2;40, 3;40, 4;40, kemudian dilakukan pemeriksaan dari produk templat DNA *Wuchereria bancrofti*. Analisis data menggunakan grafik hasil amplifikasi berupa nilai Ct (*cycle threshold*). Dari hasil penelitian menunjukkan kondisi optimal untuk volume templat DNA adalah 2 μ L, sedangkan untuk jumlah siklus amplifikasi adalah 35 siklus.

Kata kunci: *Wuchereria bancrofti*, templat DNA, siklus amplifikasi, nilai Ct (*cycle threshold*)

ABSTRACT

Filariasis caused by Wuchereria bancrofti is still a health problem in Indonesia. Microscopic examination of blood as the gold standard has several disadvantages, so clinical diagnosis based on Molecular Biology is being developed, specifically the Real-Time PCR method. In this study to achieve the best results, the volume of the DNA template and the number of amplification cycles were optimized. The purpose of this study was to determine the volume of DNA templates and the optimum number of amplification cycles for detection of Wuchereria bancrofti using the Real-Time PCR method. The type of research used is a quasi-experimental. The design of the research is made a matrix of the volume of DNA templates and the number of amplification cycles, namely 2; 30, 3; 30, 4; 30, 2; 35, 3; 35, 4; 35, 2; 40, 3; 40, 4; 40, then an inspection of the Wuchereria bancrofti DNA template product was carried out. Data analysis using graphs of amplification results in the form of Ct (cycle threshold). The results showed that the optimal conditions for the volume of DNA templates were 2 μ L, while for the number of amplification cycles was 35 cycles.

Keywords: *Wuchereria bancrofti*, DNA template, amplification cycle, Ct value (*cycle threshold*)

PENDAHULUAN

Penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia adalah penyakit filariasis atau kaki gajah. Terdapat tiga jenis cacing filaria penyebab filariasis di Indonesia yaitu *Brugia malayi*, *Brugia timori*, dan *Wuchereria bancrofti*. *Brugia malayi* mempunyai penyebaran paling luas di Indonesia. *Brugia timori* hanya terdapat di Indonesia Timur yaitu di Pulau Timor, Flores, Rote, Alor, dan beberapa pulau kecil di NTT. Sedangkan *Wuchereria bancrofti* terdapat di Pulau Jawa, Bali, NTB, dan Papua. Meski *Wuchereria bancrofti* bukan merupakan jenis cacing filaria penyebab terbesar di Indonesia, jenis cacing ini tetap tidak boleh diabaikan, karena sekitar 90% infeksi filariasis di dunia disebabkan oleh *Wuchereria bancrofti*¹.

Sehingga jenis cacing filaria *Wuchereria bancrofti* perlu ditangani untuk memutus mata rantai penyebaran penyakit filariasis di Indonesia. Oleh karena itu, untuk mendukung program pemerintah dalam mengeliminasi filariasis di Indonesia, seluruh tenaga kesehatan diharapkan mampu berpartisipasi dalam hal ini sesuai dengan kompetensinya masing-masing, salah satunya oleh tenaga laboratorium medik dalam melakukan pemeriksaan sampel filariasis dengan tepat, cepat, dan akurat².

Pemeriksaan filariasis metode PCR konvensional dan *Real-Time* PCR sudah dikembangkan untuk diagnosis infeksi filariasis limfatik secara Biologi Molekular. Pemeriksaan PCR ini dapat mendeteksi dari *Wuchereria bancrofti* pada spesimen darah manusia maupun pada vektor nyamuk³. Seiring dengan perkembangan teknologi di dunia kesehatan, *Real-Time* PCR sudah mulai menggantikan PCR konvensional, karena *Real-Time* PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi. Sehingga, baik dari segi teknis

maupun praktis lebih menguntungkan dibanding PCR konvensional⁴.

Untuk melakukan proses *Real-Time* PCR terdapat berbagai komponen yang akan berpengaruh terhadap produk hasil amplifikasi, komponen-komponen tersebut antara lain: PCR master mix, primers, fluorescent probes, SYBR Green, magnesium klorida (bila kit yang digunakan menggunakan buffer yang berpisah), templat DNA, siklus amplifikasi, suhu, kontrol PCR, dan ROX pasif⁵.

Untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor yang mempengaruhi komponen-komponen diatas, seperti konsentrasi, volume, jumlah siklus, maupun kondisi lingkungan⁶. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut terhadap sampel filariasis di wilayah yang endemik untuk mengidentifikasi *Wuchereria bancrofti* sebaiknya dilakukan optimasi komponen-komponen *Real-Time* PCR terlebih dahulu untuk memperoleh produk PCR yang berkualitas dan berkuantitas tinggi⁷.

Pada penelitian ini difokuskan melakukan optimasi terhadap dua komponen yang berpengaruh terhadap keberhasilan produk PCR yaitu volume templat DNA dan siklus amplifikasi. Volume templat DNA berkaitan dengan jumlah templat DNA yang ditambahkan, dimana apabila terlalu banyak DNA yang ditambahkan akan menghambat reaksi dan apabila terlalu sedikit mungkin tidak akan terdeteksi⁵. Sedangkan pada jumlah siklus amplifikasi berkaitan terhadap efisiensi waktu yang digunakan, tetapi kualitas produk akhir juga menjadi poin penting dalam proses PCR, dimana apabila

terlalu banyak siklus dapat meningkatkan jumlah dan kompleksitas produk non-spesifik, sedangkan apabila terlalu sedikit siklus akan menghasilkan produk PCR yang rendah⁴.

METODE

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen semu, yaitu suatu metode penelitian yang dilakukan untuk mengetahui atau menyelidiki hubungan sebab akibat dan suatu gejala atau pengaruh yang timbul dengan cara memberikan intervensi atau perlakuan terhadap suatu variabel sehingga diharapkan adanya perubahan pada variabel yang lainnya, dan kemudian hasil dari intervensi tersebut dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Sedangkan desain penelitian atau rancangan penelitian yang digunakan adalah *Static Group Comparison*.

Desain penelitian ini dilakukan matriks terhadap volume templat DNA *Wuchereria bancrofti* dengan jumlah siklus amplifikasi. Kemudian hasil dari variasi perlakuan volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi diamati pada monitor UPS *Swift Spectrum™ 48 Real Time Thermal Cycler* berupa grafik yang menggambarkan nilai Ct (*cycle threshold*) yang menginterpretasikan jumlah ampikon yang dihasilkan dari hasil amplifikasi.

Waktu pelaksanaan kegiatan penelitian dimulai pada bulan Maret hingga Mei 2019.

CARA PENGUMPULAN DAN PENGOLAHAN DATA

Data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer dari grafik berupa nilai Ct (*cycle threshold*) yang didapatkan dari hasil memberikan perlakuan berbagai variasi terhadap matriks produk templat DNA *Wuchereria bancrofti* menggunakan metode *Real-Time PCR*.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu dengan mengamati

grafik nilai Ct (*cycle threshold*) yang terbentuk sebagai gambaran dari jumlah ampikon yang dihasilkan.

HASIL OPTIMASI TERHADAP VOLUME TEMPLAT DNA DAN JUMLAH SIKLUS AMPLIFIKASI

Pada penelitian ini dilakukan optimasi terhadap volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi untuk deteksi *Wuchereria bancrofti* menggunakan metode *Real-Time PCR*. Hasil nilai Ct (*cycle threshold*) yang sebanding dengan jumlah ampikon yang dihasilkan dari hasil amplifikasi didapatkan nilai Ct seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Nilai Ct (*cycle threshold*) dari hasil amplifikasi

Siklus Amplifikasi	Volume Templat DNA			Kontrol Negatif
	2 µL	3 µL	4 µL	
30	17.83	17.62	17.32	0
35	17.93	17.43	17.33	0
40	18.69	17.69	16.49	0

Berdasarkan tabel 1, hasil amplifikasi menunjukkan nilai Ct (*cycle threshold*) dari setiap variasinya berada pada kisaran 16 hingga 18, dimana keseluruhan hasil tersebut memberikan nilai yang baik dan dapat dikatakan optimal karena masih pada rentang <29⁸.

Keseluruhan nilai Ct dari setiap variasi, dapat terlihat bahwa pada konsentrasi templat DNA 1,9 ng/µL semakin besar volume template DNA yang ditambahkan maka semakin kecil nilai Ct yang dihasilkan, sehingga akan semakin banyak jumlah ampikon yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan nilai Ct dikaitkan dengan jumlah ampikon yang dihasilkan dalam reaksi. Semakin rendah nilai Ct, semakin banyak produk PCR yang hadir. Hal ini dikarenakan dibutuhkan lebih sedikit siklus amplifikasi agar produk tersebut dapat terdeteksi melalui *fluorescent*⁸.

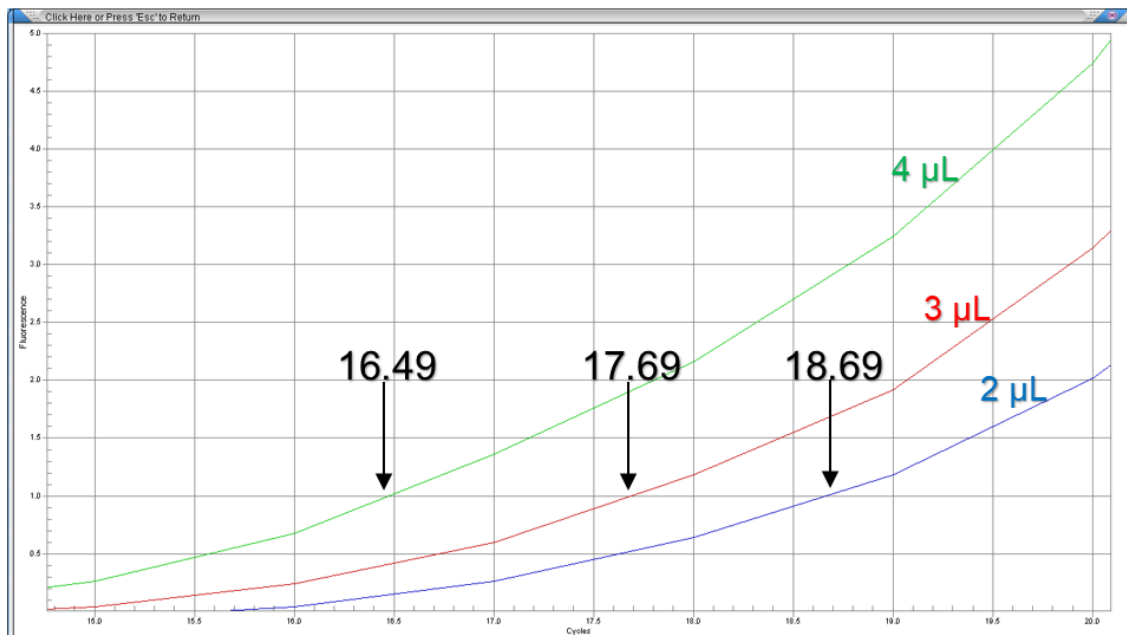
Sedangkan untuk jumlah siklus amplifikasi jika dilihat dari tabel 1, tidak memberikan perbedaan nilai Ct yang dihasilkan antar variasinya. Hanya saja pada siklus 40, terdapat perbedaan antar variasi volume template DNA yang ditambahkan. Tetapi secara keseluruhan, nilai Ct dari variasi jumlah siklus amplifikasi menunjukkan hasil yang baik.

Validasi pemeriksaan selalu dilakukan setiap kali *running* menggunakan kontrol negatif berupa NTC (Non Templat Control). Hasil dari pengukuran kontrol negatif menunjukkan hasil negatif yang

ditandai dengan tidak meningkat melewati *threshold*, sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel yang dikerjakan adalah valid.

OPTIMASI VOLUME TEMPLAT DNA

Optimasi volume templat DNA dengan variasi 2 μL ; 3 μL ; 4 μL menunjukkan bahwa perbedaan volume akan memberikan hasil yang berbeda pada gambaran grafik nilai Ct (*cycle threshold*). Secara umum, ketiga variasi volume yang dilakukan memberikan hasil yang baik yaitu berada pada kisaran nilai Ct 16 hingga 20, seperti pada gambar 1.

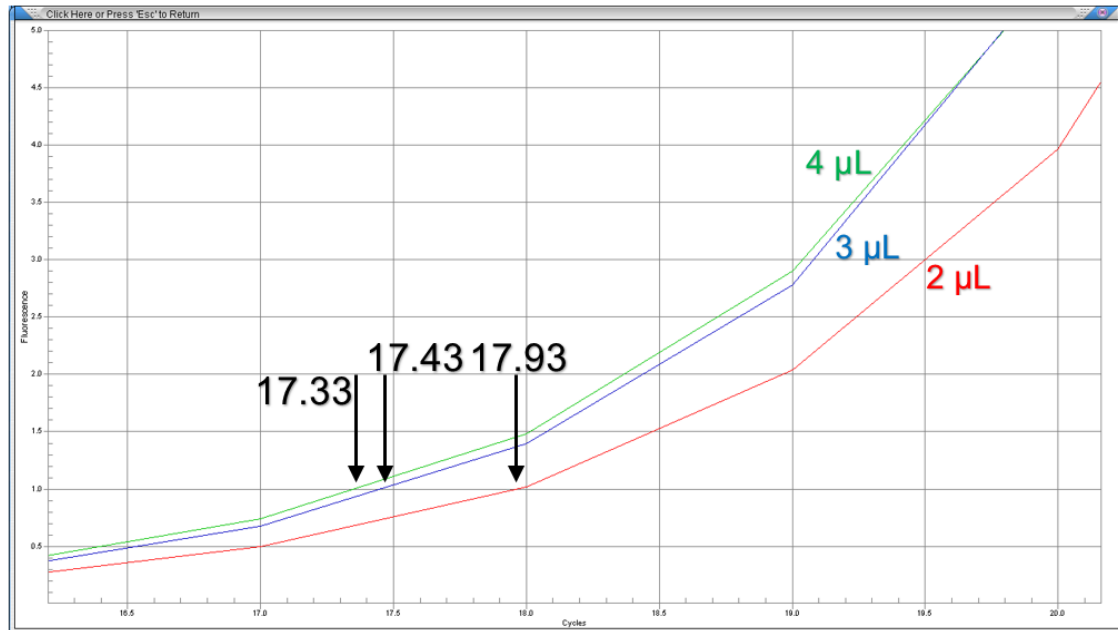


Gambar 1. Grafik nilai Ct (*cycle threshold*) pada siklus 40

Garis berwarna hijau menunjukkan volume 4 μL , garis berwarna merah menunjukkan volume 3 μL , dan garis berwarna biru menunjukkan volume 2 μL . Berdasarkan grafik diatas, nilai Ct yang muncul pertama kali yaitu pada volume 4 μL , kemudian 3 μL , lalu yang terakhir 2 μL . Hal ini sesuai dengan teori bahwa pada konsentrasi tertentu volume yang lebih banyak tentu

memiliki konsentrasi DNA yang lebih banyak pula jika dibandingkan dengan volume yang lebih sedikit sehingga akan berbanding lurus terhadap nilai Ct yang dihasilkan sebagai gambaran hasil amplifikasi⁵.

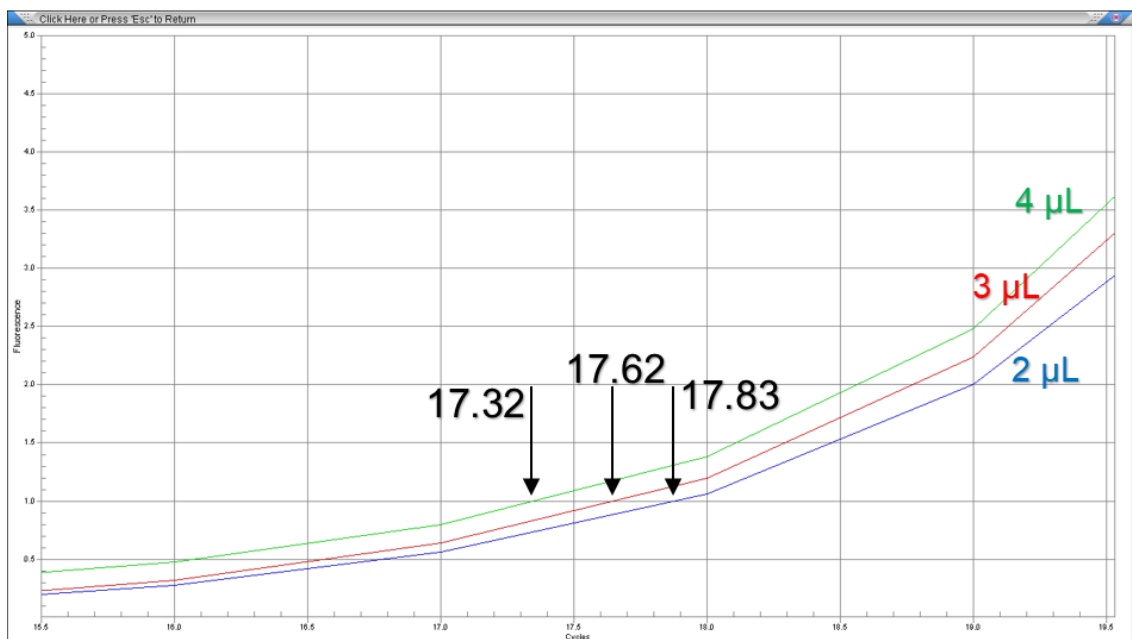
Optimasi volume templat DNA dengan variasi yang sama pun diuji pada siklus yang berbeda yaitu 35 dan 30, seperti pada gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Grafik nilai Ct (*cycle threshold*) pada siklus 35

Pada grafik hasil optimasi volume templat DNA yang di-*running* pada siklus 35, ketiga variasi volume templat DNA menunjukkan muncul tidak jauh berbeda yaitu pada rentang nilai Ct 17, tetapi nilai Ct yang muncul pertama kali tetap pada volume 4 µL, kemudian 3 µL, lalu 2 µL, dimana hal ini sesuai dengan teori mengenai kandungan templat DNA, seperti yang dinyatakan

pada siklus 40. Tetapi hasil optimasi volume template DNA pada siklus 35 ini menunjukkan nilai Ct yang baik, baik volume 2 µL, 3 µL, maupun 4 µL. Validasi hasil dapat dilihat dari kontrol negatif berupa NTC (*Non Templat Control*) dengan garis berwarna merah tua pada grafik 2, kontrol negatif menunjukkan hasil yang negatif dengan tidak munculnya nilai Ct sama sekali.



Gambar 3. Grafik nilai Ct (*cycle threshold*) pada siklus 30

Pada grafik hasil optimasi volume templat DNA yang di-*running* pada siklus 30 tidak jauh berbeda dengan grafik siklus 35, dimana ketiga variasi volume templat DNA menunjukkan muncul tidak jauh berbeda yaitu pada rentang nilai Ct 17, tetapi nilai Ct yang muncul pertama kali tetap pada volume 4 μ L, kemudian 3 μ L, lalu 2 μ L, dimana hal ini sesuai dengan teori mengenai kandungan templat DNA, seperti yang dinyatakan pada siklus 40. Validasi hasil pada siklus ini sama dengan sebelumnya yaitu kontrol negatif berupa NTC (*Non Templat Control*) dengan garis berwarna biru muda pada grafik 3, kontrol negatif menunjukkan hasil yang negatif dengan tidak munculnya nilai Ct sama sekali.

OPTIMASI JUMLAH SIKLUS AMPLIFIKASI

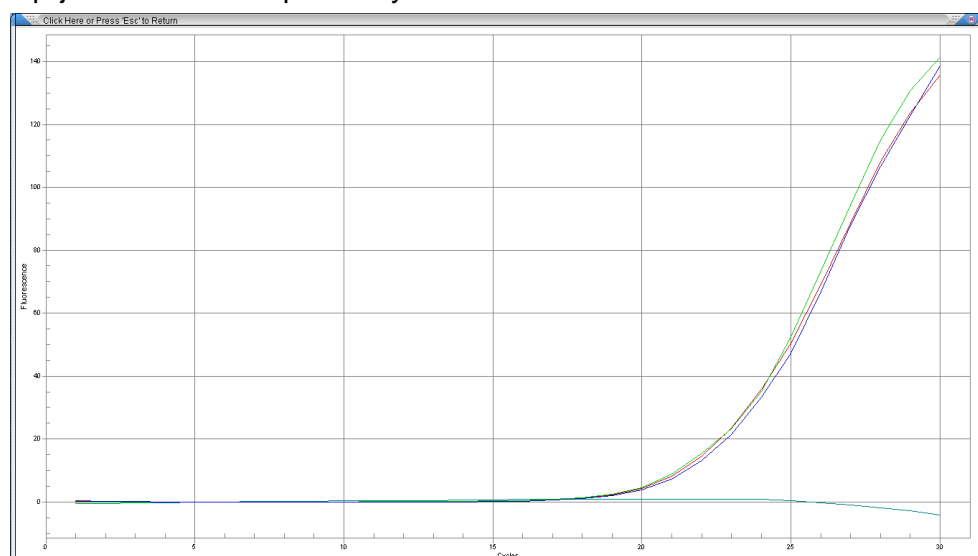
Optimasi jumlah siklus amplifikasi dengan variasi 30 ; 35 ; 40 menunjukkan bahwa perbedaan banyaknya siklus yang dipakai akan memberikan hasil yang berbeda pada gambaran grafik nilai Ct (*cycle threshold*). Hasil pengamatan dilihat dari nilai Ct yang dihasilkan terhadap volume templat DNA.

Adapun hasil amplifikasi terbaik terhadap jumlah siklus amplifikasi yaitu

pada siklus 40, seperti pada gambar 1, dimana pada gambaran grafik tersebut memberikan rentang perbedaan nilai Ct terhadap variasi volume templat DNA yaitu berada pada kisaran 16, 17, dan 18. Sedangkan pada siklus 30 dan 35, perbedaan antar variasi volume templat DNA tidak jauh berbeda yaitu keseluruhan menunjukkan nilai Ct berada pada kisaran 17.

Hal yang menyebabkan adanya perbedaan hasil amplifikasi pada siklus 40 terhadap variasi volume templat DNA yang dapat dilihat pada grafik 1 dikarenakan pada siklus 40 produk PCR akan meningkat dengan sangat baik, serta dimungkinkan karena memiliki waktu yang lebih lama sehingga pemisahan antar variasinya lebih lama pula⁴. Oleh karena itu, pada siklus 40 memberikan hasil yang lebih sensitive terhadap variasi volume templat DNA, dimana variasi tersebut mengandung konsentrasi DNA yang berbeda.

Namun, meski pada siklus 35 dan 30, seperti gambar 2 dan 3, tidak memberikan perbedaan antar variasi volume templat DNA, pada kedua siklus ini tetap memberikan hasil nilai Ct yang baik, sehingga dari ketiga siklus yang diuji secara keseluruhan hasil amplifikasi dinyatakan baik dengan nilai Ct seperti pada tabel 1.



Gambar 4. Grafik keseluruhan hasil amplifikasi pada siklus 30

Namun, berbeda dengan hasil amplifikasi pada siklus 30, seperti pada gambar 4.4, grafik menunjukkan fase plateau yang tidak mencapai titik akhir, hal ini dikarenakan amplifikasi tidak kian melambat. Titik akhir fase plateau menunjukkan semua reagen, seperti nukleotida, telah digunakan dalam reaksi PCR, amplifikasi akan melambat, hal ini adalah wilayah di mana tidak ada lagi produk PCR yang tidak dapat diproduksi. Sedangkan pada gambar 4 menunjukkan semua reagen belum habis diproduksi dengan tidak terdapatnya dataran pada akhir amplifikasi. Meskipun memang nilai Ct yang tetap menjadi indikator keberhasilan amplifikasi dan fase akhir tidak memberikan makna yang berarti terhadap keberhasilan amplifikasi⁹.

Oleh karena itu, apabila ingin mengambil tujuan dari penelitian ini berdasarkan latar belakang yang menjadi landasan yaitu untuk meningkatkan efisiensi waktu kerja dapat digunakan siklus 35.

Waktu kerja alat yang dihabiskan selama satu kali *running* pada siklus 40 menghabiskan waktu selama 1 jam 34 menit. Tentu saja pada siklus 35 maupun 30 memiliki waktu kerja alat yang berbeda dengan siklus 40, lebih tepatnya akan menghabiskan waktu yang lebih singkat dibanding siklus 40. Pada siklus 35 akan menghabiskan waktu selama 1 jam 15 menit, sedangkan pada siklus 30 akan menghabiskan waktu selama 1 jam 6 menit.

PEMBAHASAN

Berdasarkan gambar 2 dan 3 diatas, dapat dilihat dari ketiga variasi templat DNA yaitu 2 μ L, 3 μ L, dan 4 μ L hasil nilai Ct yang dihasilkan tidak jauh berbeda karena ketiga variasi tersebut menunjukkan hasil yang baik, Ketiga garis variasi volume template DNA pada grafik muncul berurutan dimulai dari volume terbesar hingga volume terkecil, berbanding lurus terhadap nilai Ct yang dihasilkan.

Salah satu keberhasilan dari hasil amplifikasi adalah volume templat DNA. Terlihatnya perbedaan dari ketiga variasi tersebut membuktikan adanya peran dari volume templat DNA yang sangat mempengaruhi hasil amplifikasi, dimana apabila terlalu banyak DNA yang ditambahkan akan menghambat reaksi dan apabila terlalu sedikit mungkin tidak akan terdeteksi⁵. Pada penelitian ini, volume templat DNA terkecil yang memberikan hasil yang baik untuk meningkatkan efisiensi penggunaan bahan adalah 2 μ L, dengan konsentrasi 3,8 ng/ μ L. Sehingga tujuan dari penelitian ini berdasarkan latar belakang yang menjadi landasan yaitu untuk meningkatkan efisiensi penggunaan bahan dapat tercapai.

Sedangkan berdasarkan hasil optimasi yang dilakukan terhadap jumlah siklus amplifikasi untuk dapat menghasilkan produk PCR yang baik serta meningkatkan efisiensi waktu kerja, siklus yang baik digunakan adalah siklus 35. Akan tetapi jumlah siklus amplifikasi hanya pada deteksi spesies tertentu saja, dalam penelitian ini yaitu *Wuchereria bancrofti*.

SIMPULAN

Setelah dilakukan optimasi terhadap volume templat DNA dan jumlah siklus amplifikasi untuk deteksi *Wuchereria bancrofti* dengan metode Real-Time PCR dapat disimpulkan bahwa dalam meningkatkan efisiensi bahan dan waktu kerja maka cukup menggunakan templat DNA sebesar 2 μ L dan menggunakan siklus sebanyak 35.

Untuk penelitian selanjutnya disarankan menggunakan spesimen klinis manusia yang mengandung antigen mikrofilaria yang lebih kompleks sehingga dapat diambil kesimpulan yang lebih bermakna dan jelas tingkat perbedaannya, serta agar dapat diteliti pula limit deteksi yang dapat terbaca oleh metode tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pusat Data Informasi Kementerian Kesehatan RI. 2016. Filariasis: Situasi Filariasis di Indonesia Tahun 2015: Bulan Eliminasi Kaki Gajah (BELKAGA). Jakarta Selatan: Kementerian Kesehatan RI.
2. Menteri Kesehatan RI. 2014. Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 94 Tahun 2014 tentang Penanggulangan Filariasis. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
3. Rao, Ramakrisna U., Laura J. Atkinson, Reda M. R. Ramzy, Hanan Helmy, Hoda A. Farid, Moses J. Bockarie, Melinda Susapu, Sandra J. Laney, Steven A. Williams, and Gary J. Weil. 2006. *A Real-Time PCR-Based Assay For Detection Of Wuchereria bancrofti In Blood And Mosquitoes*. NCBI.
4. Pestana, Ericka A., Sandor Belak, Adama Diallo, John R. Crowther, and Gerrit J. Viljoen. 2010. *Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular*. London New York: Springer.
5. Edwards, K. J. 2009. *Performing Real-Time PCR*. Vol. 4, in *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, by Kirstin Edwards, Nick Saunders Julie Logan. London: Caister Academic Press.
6. Handoyo, Darmo, and Ari Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR).
7. Aqzayunarsih, Irma Andriani, Rosana Agus, and Onny Nurrahman Marwayana. Optimasi PCR: Konsentrasi Primer dan Volume Template DNA pada Amplifikasi mtDNA Ikan Medaka *Oryzias* spp. di Daerah Aliran Sungai (DAS) Maros.
8. QIAGEN, 2010. *Critical Factors for Successful Real-Time PCR*. California, USA: Sample & Assay Technologies.
9. Top Tip Bio. 2019. *What Is A Cycle Threshold (Ct) Value In qPCR*.