

## METODE CEPAT EKSTRAKSI DNA *Corynebacterium diphtheriae* UNTUK PEMERIKSAAN PCR

Sunarno<sup>1,4\*</sup>, Fauzul Muna<sup>1</sup>, Nyoman Fitri<sup>1</sup>, Amarila Malik<sup>2</sup>, Anis Karuniawati<sup>3</sup> dan  
Amin Soebandrio<sup>3</sup>

1. Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Jl. Percetakan Negara No. 29 Jakarta, Indonesia
2. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia
3. Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
4. Program Doktor Ilmu Biomedik, FKUI

\*Email: [no\\_nar@yahoo.com](mailto:no_nar@yahoo.com)

### **QUICK METHOD TO EXTRACT CORYNEBACTERIUM DIPHTERINAE DNA FOR PCR EXAMINATION**

#### **Abstract**

*Diagnosis of diphtheria caused by Corynebacterium diphtheriae should be done immediately since delay of therapy may cause 20-fold increase rate of death. One method of rapid diagnostic to identify diphtheria is by using polymerase chain reaction (PCR). The fundamental issue of this method depends on the DNA, either its quality or quantity. The simple DNA extraction method, which is using mechanical/physical principles with a little of chemical reagents (such as boiling method and the use of sodium hydroxide (NaOH)), will have some benefits, such as easy to be performed, low cost, fast, and environmentally friendly. This study aimed to evaluate effectivity and efficiency of boiling method with NaOH to extract DNA of C. diphtheriae compared to the use of a commercial diagnostic kit for PCR assay. We used C. diphtheriae toxigenic (NCTC 10648) isolates, which are grown in blood agar plates. We then prepared the suspensions of cell/colony in aquadest with several dilutions. Each dilution was extracted using boiling method, NaOH and controlled with the use of a commercial diagnostic kit (QiAmp DNA Minikit). The results were evaluated quantitatively with spectrophotometer and qualitatively with gel electrophoresis. The results showed that the extracted DNA from boiling method with NaOH has an adequate quality and quantity for PCR assay (up to 9 CFU/uL cell/reaction). Therefore, it can be summarized that boiling method with NaOH is effective and efficient to be applied in PCR assay for C. diphtheriae.*

*Key words: boiling extraction method, NaOH, C.diphtheriae, PCR*

#### **Abstrak**

Kematian kasus difteri yang disebabkan oleh *Corynebacterium diphtheriae* dapat meningkat 20 kali lipat karena keterlambatan pengobatan sehingga penegakan diagnosis harus dilakukan sesegera mungkin. Salah satu metode diagnostik yang cukup cepat untuk mendeteksi penyakit difteri adalah pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR). Keberhasilan pemeriksaan PCR dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas DNA. Metode ekstraksi DNA sederhana menggunakan prinsip mekanik/fisika dengan reagen kimia minimalis, seperti metode pemanasan (*boiling*) dan penggunaan (NaOH) memiliki beberapa kelebihan, diantaranya mudah dilakukan, biaya murah, waktu yang dibutuhkan singkat dan lebih ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk menilai efektifitas dan efisiensi metode *boiling* dan NaOH untuk ekstraksi DNA *C.diphtheriae* dibandingkan dengan penggunaan kit komersial dalam pemeriksaan PCR. Sampel berupa isolat *C.diphtheriae* toksigenik (NCTC 10648), ditumbuhkan dalam blood agar, kemudian dibuat suspensi sel/koloni dalam aquadest dengan beberapa kali pengenceran. Masing-masing pengenceran diekstraksi dengan metode *boiling* dan NaOH yang terkontrol dengan kit komersial (QiAmp DNA Minikit). Hasil ekstraksi dinilai secara kuantitatif dengan spektrofotometer dan secara kualitatif dengan gel elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi dengan metode *boiling* dan NaOH mempunyai kualitas dan kuantitas yang cukup untuk pemeriksaan PCR hingga 9 CFU/uL sel bakteri/reaksi sehingga dapat disimpulkan bahwa metode *boiling* dan NaOH cukup efektif dan efisien untuk diaplikasikan pada metode PCR untuk *C.diphtheriae*.

Kata Kunci: *boiling*, NaOH, *C.diphtheriae*, PCR

## PENDAHULUAN

*Corynebacterium diphtheriae* merupakan bakteri penyebab penyakit difteri. Diagnosis difteri harus segera ditegakkan karena keterlambatan diagnosis dan penatalaksanaan dapat meningkatkan kematian kasus hingga 20 kali lipat.<sup>1</sup> Diagnosis difteri secara klinis tidak mudah dilakukan, terutama pada stadium awal atau pada serangan ringan. Manifestasi klinis penyakit difteri pada stadium awal atau kondisi ringan menyerupai faringitis atau laringitis yang disebabkan oleh mikroorganisme lain.<sup>2</sup> Kasus difteri jarang terjadi sehingga para dokter/klinisi kurang memahami penyakit tersebut yang berakibat pada keterlambatan penegakan diagnosis.<sup>3</sup> Metode diagnostik cepat sangat dibutuhkan untuk membantu menegakkan diagnosis difteri.

Salah satu metode diagnostik cepat untuk mendeteksi penyakit difteri adalah pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR). Pengembangan PCR untuk pemeriksaan difteri telah dilakukan sebelumnya, antara lain oleh Nakao, et al. (1997), Pimenta, et al. (2007) dan Sunarno, dkk (2011). Pemeriksaan PCR memiliki beberapa kelebihan diantaranya lebih mudah dilakukan, bahan laboratorium lebih mudah didapat dan lebih cepat mendapatkan hasil. Keistimewaan lain dari PCR adalah dapat membedakan jenis *C.diphtheriae* toksigenik dan nontoksigenik.<sup>4,5,6</sup>

Keberhasilan pemeriksaan PCR dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya kualitas dan kuantitas sampel yang berupa materi genetik DNA *C.diphtheriae*. Kuantitas sampel dibutuhkan untuk proses amplifikasi sehingga pada akhir pemeriksaan didapatkan jumlah potongan DNA yang cukup untuk divisualisasi dengan *UV transillumination*. Kualitas sampel yang baik dibutuhkan untuk meminimalisasi adanya partikel lain yang dapat menghambat proses amplifikasi, misalnya EDTA, DNA-se, dan protein atau lipid yang dapat menutupi DNA target.<sup>7,8</sup>

Beberapa metode ekstraksi DNA dikembangkan untuk mendapatkan hasil terbaik. Tapi, pengembangan metode ekstraksi DNA biasanya diikuti dengan konsekuensi peningkatan biaya yang dibutuhkan. Hal lain yang menjadi masalah dalam ekstraksi DNA adalah lamanya waktu untuk proses ekstraksi sehingga harus menunggu berjam-jam hanya untuk mendapatkan sampel yang baik. Selain itu, pemakaian beragam reagen

kimia dapat membahayakan ekosistem bila tidak dikelola dengan baik. Di sisi lain, metode ekstraksi DNA sederhana menggunakan prinsip mekanik/fisika dengan reagen kimia minimalis, seperti metode *boiling* dan penggunaan *sodium hydroxide* (NAOH) memiliki beberapa kelebihan, diantaranya mudah dilakukan, biaya murah, waktu yang dibutuhkan singkat dan lebih ramah lingkungan.<sup>9,10</sup>

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efektifitas dan efisiensi metode *boiling* dan NAOH dalam pemeriksaan PCR. Metode *boiling* dengan beberapa modifikasi telah berhasil digunakan untuk ekstraksi *whole blood cell* dari eukaryote, *Echinococcus granulosus* (parasit), *Salmonella enteritica* (bakteri gram negatif) dan *Streptococcus suis* (bakteri gram positif).<sup>11,12,13,4</sup> Metode NAOH juga telah terbukti berhasil digunakan untuk ekstraksi *Echinococcus granulosus* dan fungi.<sup>12,15</sup> Aplikasi kedua metode ini untuk sampel *C. diphtheriae* perlu dibuktikan mengingat pada penelitian yang dilakukan Osmundson, et al. terhadap fungi dan oomycete menunjukkan hasil yang bervariasi tergantung sampel yang digunakan.<sup>11</sup> Penelitian ini bertujuan untuk menilai efektifitas dan efisiensi metode *boiling* dan NAOH untuk ekstraksi DNA *C.diphtheriae* dibandingkan dengan penggunaan kit komersial (QiAmp DNA Minikit) untuk pemeriksaan PCR. Penelitian perlu dilakukan mengingat aplikasi kedua metode tersebut dapat menghemat biaya dan mempercepat waktu pemeriksaan serta mendukung upaya penggunaan teknologi ramah lingkungan.

## BAHAN DAN METODE

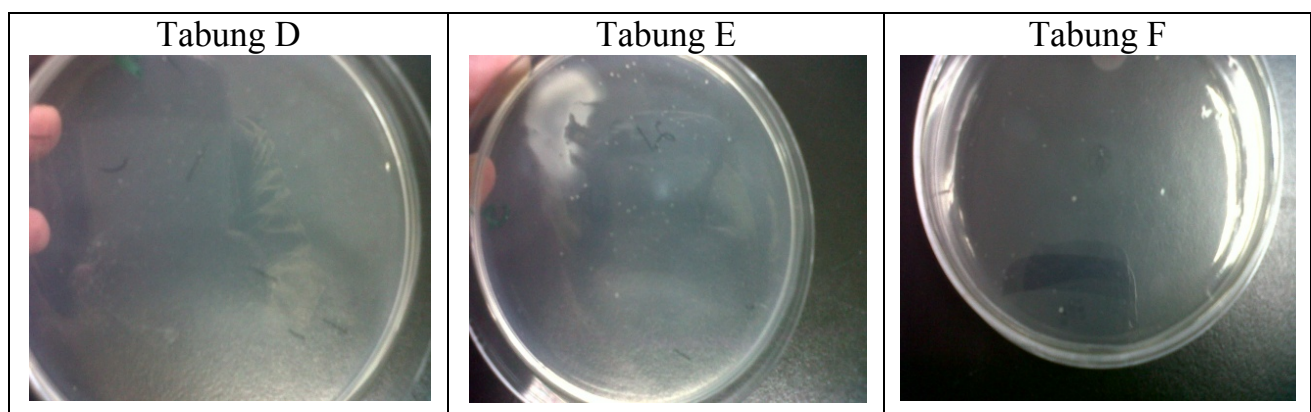
### Sampel

Sampel berupa isolat *C.diphtheriae* toksigenik (*National Collection of Type Cultures*: NCTC 10648) milik Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang berasal dari *Health Protection Agency* (HPA), UK melalui Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Isolat ditumbuhkan pada *blood agar plate*, kemudian dibuat suspensi sel/koloni dalam aquadest dan diencerkan dengan pengenceran 10x secara berjenjang. Sampel pada Tabung A diambil 1 mL dimasukkan

Tabung B yang berisi 9 mL aquadest. Setelah divortex, sampel pada Tabung B diambil 1 mL dimasukkan Tabung C yang berisi 9 mL aquadest dan begitu seterusnya sampai dengan pengenceran pada Tabung F. Jumlah sel pada masing-masing pengenceran dihitung dengan menumbuhkannya pada *plate count agar* (PCA). Sebanyak 1 uL suspensi sel dicampur dengan 10 mL Nutrien Agar yang dicairkan, dituang dalam petri dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Jumlah koloni dalam *plate* dihitung secara manual dengan bantuan kaca pembesar. Gambaran koloni pada PCA disajikan pada Gambar 1.

### **Ekstraksi DNA**

Tiap suspensi diekstraksi menggunakan metode *boiling* dan NAOH. Sebagai pembanding digunakan kit komersial (QiAmp DNA Minikit). Pada metode *boiling*, 10 uL suspensi sel bakteri dimasukkan dalam tabung mikro (eppendorf) 1,5 mL yang berisi 90 uL TE buffer (volume sampel: volume total 1:10) dan diinkubasi pada suhu 100 °C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 3 menit. Keseluruhan proses membutuhkan waktu kurang lebih 15 menit. Supernatant dipisahkan dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan



**Gambar 1. Koloni bakteri pada PCA (gambar diambil dengan kamera Blackberry): Tabung D. Pengenceran 10<sup>-3</sup>, Tabung E. Pengenceran 10<sup>-4</sup>, Tabung F. Pengenceran 10<sup>-5</sup>**

sebagai template DNA. Pada metode dengan NAOH, 25 uL suspensi sel dimasukkan dalam microtube 1,5 mL yang berisi 100 uL NAOH 25 uM, diinkubasi pada suhu 88 °C selama 7 menit. Kemudian ditambahkan 100 uL TE buffer dan 25 uL aquadest, disentrifugasi dengan kekuatan 4000 rpm selama 3 menit. Keseluruhan proses membutuhkan waktu kurang lebih 12 menit. Supernatant dipisahkan dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan sebagai template DNA.

Prosedur ekstraksi menggunakan QiAmp DNA Minikit mengikuti petunjuk dari perusahaan dengan sedikit modifikasi pada volume sampel dan volume akhir. Sebanyak 200 uL suspensi sel dimasukkan dalam microtube 1,5 mL ditambahkan dengan 20 uL proteinase K dan 200 uL buffer AL, divortex dengan halus selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15 menit dan 96 °C selama 10 menit. Campuran tersebut ditambah dengan 200 uL ethanol absolut, divortex dengan halus selama 15 detik, kemudian dipindahkan

dalam tube berfilter (mini column) dan disentrifugase dengan kekuatan 8000 rpm selama 3 menit. Supernatant dibuang dan filter dibilas dengan 750 uL buffer AW1, disentrifugasi 8000 rpm selama 3 menit dan supernatant dibuang. Proses pembilasan ini dilakukan lagi dengan cara yang sama menggunakan buffer AW2. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kering dengan kekuatan 14000 rpm selama 1 menit. Terakhir, filter ditempatkan pada tube baru, dibilas dengan 200 uL buffer AE, dan disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Filter dibuang dan supernatant disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan sebagai template DNA. Keseluruhan proses membutuhkan waktu sekitar 2 jam.

### **PCR dan Elektroforesis**

Proses amplifikasi dilakukan dengan prinsip PCR Multipleks yang telah dikembangkan sebelumnya<sup>6</sup> menggunakan 9 (5 pasang) primer

(Integrated DNA Technologies), yaitu 2 pasang primer yang mempunyai target gen *tox/dtx* dengan panjang produk 116 bp dan 551 bp, sepasang primer yang mempunyai target gen *dtxR* dengan panjang produk 167 bp, dan 2 pasang primer dengan target gen *pld* dengan panjang produk 250 bp dan 350 bp. (Catatan: meskipun gen target dapat diamplifikasi hanya dengan 3 pasang primer, tapi pada penelitian ini digunakan 5 pasang primer karena penelitian ini merupakan 1 rangkaian pengembangan diagnostik difteri dengan PCR Multipleks yang menggunakan 5 pasang primer). Volume final sebanyak 25 uL terdiri dari 12,5 uL Kapa Multiplex 2G fast (Kapa Biosystem) yang berisi DNA polymerase 1 U, PCR buffer, dNTP 0,2 mM, MgCl 3 mM dan stabilizer, ditambah dengan 0,5 uL (0,2 uM) masing-masing primer, 6 uL molecular water (Genekam) dan 2,5 uL template DNA. Proses amplifikasi menggunakan mesin *thermal cycler* C1000 (Biorad) mengikuti kondisi PCR sebagai berikut: 95 °C selama 3 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari 95 °C selama 15 detik, 60 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik. Produk PCR (amplikon) dipisahkan dengan mesin elektroforesis (150 Volt selama 30 menit) pada 2% gel agarose (Genekam) yang distaining dengan Gel red (Biorad) menggunakan TBE buffer (Invitrogen). Hasil divisualisasi dengan Gel doc XR plus (Biorad).

## HASIL

### Sampel

Jumlah sel bakteri dihitung berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh pada PCA. Hasil hitung koloni bakteri disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil hitung koloni bakteri dalam 1 uL sampel pada masing-masing pengenceran**

Tabung	Pengenceran	Jumlah Koloni
A	0	$\pm 71 \times 10^4$ CFU
B	$10^{-1}$	$\pm 71 \times 10^3$ CFU
C	$10^{-2}$	$\pm 71 \times 10^2$ CFU
D	$10^{-3}$	$\pm 71 \times 10^1$ CFU
E	$10^{-4}$	71 CFU
F	$10^{-5}$	9 CFU

Tabel 1. memperlihatkan bahwa koloni bakteri masih terlihat sampai dengan pengenceran  $10^{-5}$  yaitu dalam 1 uL sampel terdapat kurang lebih 9 sel bakteri.

### Ekstraksi DNA

Kuantitas DNA hasil ekstraksi dengan 3 metode yang berbeda diukur menggunakan spektrofotometer (NanoDrop: Thermo Scientific). Hasil pengukuran pada masing-masing sampel disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2. Rerata konsentrasi DNA pada tiap pengenceran sampel yang diekstraksi dengan metode *boiling*, NaOH dan Qiamp DNA Minikit**

Tabung	Boiling (ng/uL)	NaOH (ng/uL)	QiAmp DNA Minikit (ng/uL)
B	109,7	144,6	110,0
C	15,5	30,7	24,0
D	4,9	6,9	5,4
E	0,7	1,6	0,7
F	0,1	0,2	0,1

Tabel 2. menunjukkan kuantitas DNA yang dinilai dengan konsentrasi DNA pada 1 uL sampel. Konsentrasi akhir DNA dalam sebuah reaksi PCR adalah konsentrasi DNA sampel dikali 2,5 (uL). Perbandingan hasil dari 3 metode hanya bisa dilakukan pada Tabung B-F karena pada Tabung A tidak bisa dinilai dengan metode *boiling* dan NaOH. Pada metode *boiling* dan NaOH, volume akhir DNA template adalah 10 x lipat lebih encer dibandingkan volume sampel awal, sedangkan pada QiAmp DNA Minikit volume DNA template sama dengan volume sampel awal. Oleh karena itu, ekstraksi DNA Tabung B dengan QiAmp DNA Minikit setara dengan ekstraksi DNA Tabung A dengan metode *boiling* dan NaOH.

### PCR dan Elektroforesis

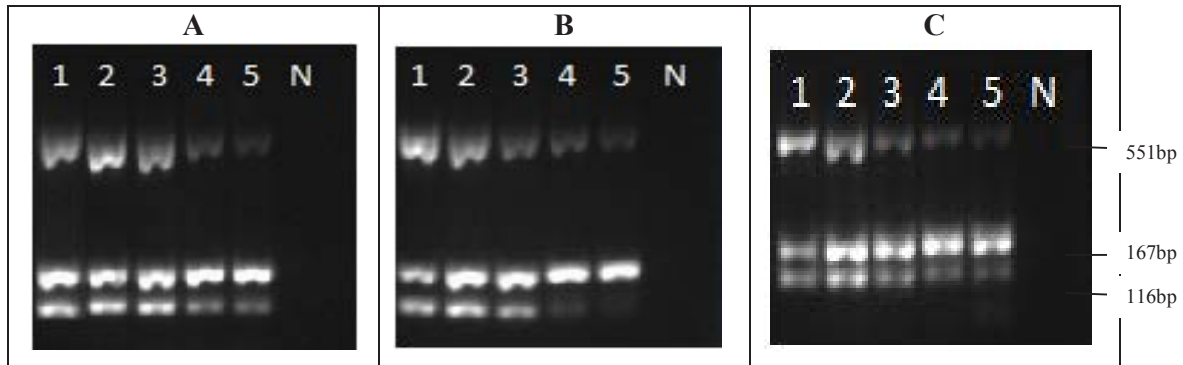
Hasil ekstraksi DNA untuk pemeriksaan PCR, secara kualitatif dinilai dari hasil elektroforesis produk PCR (amplikon) berupa penampakan pita pada tempat yang telah ditentukan sesuai panjang produk PCR dari tiap pasang primer. Selengkapnya, hasil pemeriksaan PCR

dari masing-masing metode ekstraksi disajikan pada Gambar 2 dengan keberadaan 3 pita yang merupakan penanda *C.diphtheriae* toksigenik, yaitu gen *tox A* (151 bp), gen *tox B* (116 bp) dan gen *dtxR* (167 bp).

Gambar 2. menunjukkan bahwa pada metode NaOH, ketiga pita tampak jelas hingga pengenceran  $10^{-5}$  (9 CFU/uL) seperti halnya pada QiAmp DNA Minikit. Pada metode *boiling*, ketiga pita juga masih tampak jelas

hingga pengenceran  $10^{-5}$  (9 CFU/uL), namun dengan kualitas yang sedikit lebih rendah. Pada sampel tersebut (no. 5), jumlah sel bakteri dalam satu reaksi PCR adalah  $2,5 \text{ uL} \times 9 \text{ CFU/uL} = 22\text{-}23 \text{ CFU}$ .

Efektifitas dan efisiensi metode *boiling* dan NaOH dibandingkan dengan QiAmp DNA Minikit untuk pemeriksaan PCR disajikan pada Tabel 3.



**Gambar 2**

Hasil pemeriksaan PCR: A. Metode NaOH, B. *boiling*, C. QiAmp DNA Minikit. Sampel 1 pengenceran  $10^{-1}$  ( $71 \times 10^3$  CFU/uL), sampel 2 pengenceran  $10^{-2}$  ( $71 \times 10^2$  CFU/uL), sampel 3 pengenceran  $10^{-3}$  ( $71 \times 10$  CFU/uL), sampel 4 pengenceran  $10^{-4}$  (71 CFU/uL) dan sampel 5 pengenceran  $10^{-5}$  (9 CFU/uL), N control negative (aquadest)

**Tabel 3. Perbandingan waktu, biaya, tingkat kemudahan dan aplikasi masing-masing metode ekstraksi**

	<i>Boiling</i>	NaOH	QiAmp DNA Minikit
Waktu	15 menit	12 menit	2 jam
Biaya	± Rp 3.000,-	± Rp 5.000,-	> Rp 50.000,-
Kemudahan	Sangat Mudah	Mudah	Lebih Sulit
Aplikasi untuk PCR	Baik	Sangat Baik	Sangat Baik

Tabel 3. menunjukkan bahwa dari segi waktu, metode paling cepat adalah NaOH yang berbeda beberapa menit dari metode *boiling*. Sementara itu, dari segi biaya dan tingkat kemudahan metode *boiling* sedikit lebih murah dan mudah dibandingkan NaOH. Untuk aplikasi PCR, hasil ekstraksi DNA dengan NaOH dan Qiamp DNA Minikit terlihat lebih baik dibandingkan dengan metode *boiling* terutama bila konsentrasi sampel sedikit, dimana pita tampak lebih jelas pada kedua metode (Gambar 2).

**PEMBAHASAN**

Jumlah sel bakteri pada suatu suspensi dapat diukur dengan 2 cara, yaitu semikuantitatif dengan standard McFarland dan kuantitatif dengan hitung koloni pada *plate count agar* (PCA). Pada penelitian ini jumlah sel bakteri ditentukan secara kuantitatif sehingga lebih mendekati nilai sebenarnya seperti yang tampak pada Tabel 1. Meskipun demikian, cara ini memiliki keterbatasan karena koloni yang tumbuh terlalu banyak/rapat sulit dihitung secara tepat seperti

halnya hasil hitung koloni pada Tabung A-D. Jumlah koloni yang tumbuh sangat rapat (> 300) sehingga jumlah sel bakteri dihitung berdasarkan perkalian 10 dari jumlah sel bakteri pada tabung/pengenceran berikutnya karena pengenceran dilakukan dengan perbandingan 1/10. Selain itu, perhitungan jumlah bakteri berdasarkan pada pertumbuhan koloni memungkinkan adanya bakteri yang mati tapi masih memiliki DNA utuh ikut terekstraksi sehingga jumlah sebenarnya sel bakteri bisa lebih besar dari hasil pengukuran.

Isolasi/ ekstraksi DNA diperoleh dengan cara merusak atau memecahkan dinding sel sehingga DNA keluar dari dalam sel. Pada metode *boiling*, pemanasan tinggi selama beberapa menit akan menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding sel yang berakibat pada masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel. Suhu tinggi juga bermanfaat untuk inaktivasi enzim, terutama DN-ase yang dapat merusak DNA. Suhu yang digunakan dan lamanya pemanasan tergantung sampel yang digunakan. Pada penelitian ini, pemanasan dilakukan pada suhu 100 °C selama 10 menit seperti yang dilakukan pada penelitian terdahulu.<sup>11,12,13</sup> Pemanasan dengan suhu terlalu tinggi atau waktu terlalu lama dikhawatirkan akan merusak DNA target dan akan memperlama proses ekstraksi. Ekstraksi DNA menggunakan metode *boiling* sangat mudah dilakukan dan hanya membutuhkan waktu beberapa menit, tapi kualitas DNA yang dihasilkan relatif lebih rendah dibandingkan dengan metode lain, seperti yang terlihat pada Gambar 2. Hal ini terjadi karena proses pengeluaran DNA tidak sempurna sehingga masih dimungkinkan adanya DNA yang terperangkap dalam sel. Eliminasi partikel lain juga tidak sempurna sehingga dapat menjadi inhibitor pada proses amplifikasi.

Pada metode ekstraksi dengan NaOH, kerusakan dinding sel terjadi akibat kontak sel dengan basa kuat. Penelitian yang dilakukan oleh Giotis, et.al dan Mendonca, et.al. menunjukkan bahwa kondisi basa (pH 10-12) yang ditunjang dengan peningkatan suhu terbukti menurunkan viabilitas bakteri. Pemeriksaan dengan mikroskop elektron menunjukkan terjadinya ruptur/destruksi dinding sel dan dengan spektrofotometer membuktikan terjadinya kebocoran sitoplasma dan keluarnya materi genetik (DNA). DNA akan terpisah dengan

protein dan materi sel lain karena sifat DNA yang lebih larut pada cairan dengan kondisi basa, sementara materi sel yang lain cenderung akan mengendap. Kepekaan bakteri terhadap kondisi alkali berbeda-beda tergantung dari jenisnya. Sebagai contoh, *Listeria monosytogenes* lebih resisten dibandingkan dengan *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis* meskipun ketiganya sama-sama bakteri gram negatif.<sup>16,17</sup> Penelitian ini menggunakan sampel *C.diphtheriae* yang merupakan bakteri gram positif, dimana dinding sel tersusun oleh peptidoglikan yang tebal sehingga relatif lebih kuat dibandingkan dengan bakteri gram negatif.<sup>2</sup> Meskipun demikian, Tabel 2 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa metode ekstraksi dengan NaOH cukup efektif untuk isolasi DNA *C.diphtheriae*.

Kit komersial QiAmp DNA Minikit menggunakan prinsip minicolumn atau filtrasi DNA. Pertama sel dilisis menggunakan *lysis buffer* (buffer AL). Komponen sel (terutama protein) dihancurkan dengan enzim protease (proteinase K). DNA diendapkan dengan ethanol absolut difilter dan dicuci dengan *washing buffer* (buffer AW1 dan AW2). Terakhir, DNA dilarutkan dalam *elution buffer* (buffer AE). Ekstraksi DNA dengan minicolumn merupakan metode ekstraksi yang paling umum dilakukan karena hasil yang didapatkan sangat baik dalam waktu yang tidak terlalu lama (dibandingkan metode phenol-chlorophorm) dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan *magnetic bead*. Meskipun demikian, metode ini memerlukan waktu sekitar 2 jam (cukup lama dibandingkan metode sederhana), menggunakan reagen kimia yang cukup banyak dan biayanya bisa mencapai 10 kali lipat dibandingkan metode sederhana, sebagaimana terlihat pada Tabel 3.<sup>18,19</sup>

Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dengan ketiga metode tidak terlalu berbeda seperti yang terlihat pada Tabel 1, begitu juga dengan kualitas DNA sebagai template untuk pemeriksaan PCR seperti yang terlihat pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan bahwa hasil PCR menggunakan ketiga metode ekstraksi cukup sensitif untuk mendeteksi *C.diphtheriae* sampai dengan 9 CFU/uL. Secara teori, bila efisiensi proses PCR mencapai 100 %, jumlah akhir copy DNA dalam produk PCR dengan 35 cycle adalah  $22-23 \times 3,44 \times 10^{10} = 75,68 - 79,12 \times 10^{10} = 756.800.000.000 - 791.200.000.000$  copy DNA.<sup>8</sup>

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa metode *boiling* dan NaOH dapat digunakan untuk pemeriksaan PCR *C.diphtheriae*, meskipun masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan Nakao, et.al., tapi dengan tingkat sensitifitas yang berbeda. Pada penelitian tersebut metode *boiling* kurang sensitif dibandingkan dengan Kit komersial (QIAmp Blood Kit) dan hanya dapat dipakai dengan konsentrasi bakteri minimal 150.000 CFU/reaksi.<sup>4</sup> Perbedaan hasil ini bisa terjadi karena perbedaan perlakuan sampel pada saat ekstraksi, perbedaan metode PCR yang digunakan dan bahan staining DNA pada saat elektroforesis.<sup>20</sup> Bagaimanapun juga, penelitian ini memiliki keterbatasan pada jumlah dan jenis sampel. Sampel hanya berupa isolat tersimpan yang merupakan hasil pembiakan dari 1 jenis strain (NCTC 10648). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan sampel yang lebih bervariasi, termasuk spesimen klinis untuk menilai sensitifitas dan spesifisitas kedua metode ekstraksi sebelum digunakan secara luas untuk menghindari kemungkinan *false negative*.

## KESIMPULAN

Ekstraksi DNA dengan metode *boiling* dan NaOH dapat diaplikasikan untuk pemeriksaan PCR *C.diphtheriae*. Kedua metode tersebut dapat dilakukan di berbagai laboratorium kesehatan pada semua tingkatan karena cepat, mudah, murah dan ramah lingkungan dengan hasil pemeriksaan cukup baik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, terutama Koordinator Laboratorium Bakteriologi dan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan beserta staf.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Acang N. Difteri. Dalam: Noer HMS, editor. Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Ed. ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996.
2. De Zoysa A & Efstratiou A. *Corynebacterium spp.* In: Gillespie SH & Hawkey PM. Editor. Principles and Practice of Clinical bacteriology 2<sup>nd</sup> ed. 2006. USA:John Wiley & Son, Ltd.
3. Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuopio-Varkila J, and Popovic T. Current Approaches to the Laboratory Diagnosis of Diphtheria. JID. 2000;181(Suppl 1):S138-45.
4. Nakao H & Popovic T. Development of a Direct PCR Assay for Detection of the Diphtheria Toxin Gene. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1651-1655
5. Pimenta FP, Hirata R, Rosa ACP, Milagres LG and Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. JMM.2008:1438-1439.
6. Sunarno, Kambang Sariadji, Holly Arif Wibowo. Potensi gen *dtx* dan *dtxR* sebagai marker untuk deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *Corynebacterium diphtheriae*. Bullet. Penelit. Kesehat. 2013.
7. Demeke T & Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Anal Bioanal Chem. 2010; 396:1977-1990.
8. Sachse K. Specificity and performance of diagnostic PCR assay. In: Sachse K & Frey J. Editor. PCR detection of microbial pathogens. Vol 216. 2003. Tontowa NJ: Humana Press.
9. Osmundson TW, Eyre CA, Hayden KM, Dhillon J, and Garbelotto MM. Back to Basic: An Evaluation of NaOH and Alternative rapid DNA Extraction Protocol for DNA barcoding, genotyping, and Disease Diagnostics from fungal and Oomycete samples. *Mol.Eco. Resource.* 2012;13:66-74.
10. Da Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, and Valente P. Rapid Yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz.Arch.Biol.Technol.* 2012; 55(2):319-327.
11. Asadzadeh N, Javanmard A, and Nassiry MR. Comparison of Rapid DNA Extraction Techniques for Conventional PCR-RFLP Analysis from Mammalian Whole Blood Cells. *J.Mol.Genet.* 2010;2(3-4):32-35
12. Sharbatkhori M, Kia EB, Harandi MF, Jalalizan N, and Mirhendi H. Comparison of Five Simple Methods for DNA Extraction from *Echinococcus granulosus* Protoscoleces for PCR-Amplification of Ribosomal DNA. *Iranian J. Parasitol.* 2009;4(2):54-60.
13. Medici DD, Croci L, Delibato E, Pasquale SD, Filetici E, and Toti L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR

- Green I Real-Time PCR to Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(6):3456-3461.
14. Espinosa I, Baez M, Percedo MI, Martinez S. Evaluation of simplified DNA extraction methods for *Streptococcus suis* typing. *Rev. Salud Anim.* 2013;35(1): 59-63.
  15. Griffin DW, Kellog CA, Peak KK, Shinn EA. A Rapid and Efficient Assay for Ekstracting DNA from Fungi. *Let.in Appl.Microbiol.* 2002;34:210-214.
  16. Giotis ES, Blair I and McDowell. Effects of Short-Term Alkaline Adaptation on Surface Properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. *The Open Food Science Journal.* 2009; 3:62-65.
  17. Mendonca AF, Amoroso TL and Knabel SJ. Destruction of Gram-Negative Food-Borne Pathogens by High pH Involves Disruption of the Cytoplasmic Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60(11):4009-4014.
  18. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci.* 1998;43(5):1024–1030.
  19. Hong C, Rangasamy M, Sek YT, Haichuan W, Siegfried BD, Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE*; 2010: 5(8): e11963.
  20. Warren K. A Comparative Study of the Electrophoretic Efficiencies of the Invitrogen E-Gel® Pre-cast Agarose Electrophoresis System, the Cambrex FlashGel™ System, and the GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain. Saint Martins University.