



PRIMARY SLX TEST USING REAL-TIME PCR BASED ON HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) ON MICROFILARIA EXAMINATION

UJI PRIMER SLX MENGGUNAKAN REAL-TIME PCR BERBASIS HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PADA PEMERIKSAAN MIKROFILARIA

Bagus Muhammad Ihsan ^{*}, Cecep Dani Sucipto , Khayan Khayan

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Banten, Banten-Indonesia.

Research Report
Penelitian

ABSTRACT

Background: Filariasis patients can be a source of transmission if their blood still contains microfilariae. One of the Polymerase Chain Reaction (PCR) methods used is High Resolution Melting (HRM), using primary specificity testing. **Purpose:** To test the specificity of SLX primer. The samples used for this test were isolates of *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, negative and positive controls for *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. **Method:** The design in this study is a quasi-experiment by testing the specificity of SLX primer using HRM based real-time PCR based on the Cycle Threshold (CT) value observed through the amplification curve. **Result:** The real-time PCR results showed that no CT was released in the bacterial samples, and there was a CT value in the positive control. The results of this study indicate that specific SLX primer can be used in identifying microfilariae. **Conclusion:** SLX primer have a reasonable specificity because they cannot detect the existence of microorganisms in the samples other than microfilariae.

ABSTRAK

Latar belakang: Penderita filariasis dapat menjadi sumber penular filariasis bila masih mengandung mikrofilaria dalam darahnya. Salah satu metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dapat digunakan adalah *High Resolution Melting* (HRM), dengan cara pengujian spesifitas primer yang digunakan. **Tujuan:** Untuk menguji spesifitas primer SLX. Sampel yang digunakan untuk uji ini adalah isolate bakteri *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae*, kontrol negatif dan positif *Brugia malayi* dan *Wuchereria bancrofti*. **Metode:** Desain dalam penelitian ini adalah eksperimental Laboratorium dengan menguji spesifitas dari primer SLX menggunakan *real-time* PCR berbasis HRM berdasarkan pengamatan nilai *Cycle Threshold* (CT) melalui kurva amplifikasi. **Hasil:** Pada hasil *real-time* PCR didapat bahwa tidak keluarnya nilai CT pada sampel bakteri dan terdapat nilai CT pada kontrol positif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa primer SLX spesifik dapat digunakan dalam mengidentifikasi mikrofilaria. **Kesimpulan:** Primer SLX memiliki spesifitas yang baik karena tidak dapat membaca sampel mikroorganisme lain selain mikrofilaria.

ARTICLE INFO

Received 20 May 2020
Revised 28 June 2021
Accepted 15 July 2021
Online 31 July 2021

Correspondence:
Bagus Muhammad Ihsan

E-mail :
bagusfillah@gmail.com

Keywords:
Mikrofilaria, *Real-time* PCR,
Spesifitas, *Primer SLX*

Kata kunci:
Mikrofilaria, *Real-time* PCR,
Spesifitas, *Primer SLX*

PENDAHULUAN

Filariasis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi cacing *Filaria sp.* yang ditularkan melalui gigitan berbagai jenis nyamuk antara lain nyamuk *Mansonia sp.*, *Anopheles sp.*, *Culex sp.* dan *Armigeres sp.* Filariasis di Indonesia disebabkan oleh 3 spesies cacing *Filaria sp.* yakni *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *Brugia timori*. Dari ketiga spesies ini *B. malayi* mempunyai penyebaran paling luas di Indonesia sedangkan *W. Bancrofti* terdapat di pulau Jawa, Bali, NTB dan Papua (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Menurut Santoso dan Suryaningtyas (2015), penyakit filariasis dapat menyerang semua golongan tanpa melihat usia dan jenis kelamin.

Pada tahun 2002-2015, penderita kasus filariasis mengalami kenaikan yaitu 6.571-13.032 penderita (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Meskipun filariasis bukan penyebab pertama kematian manusia, tetapi penyakit ini dapat membuat penderita menjadi cacat atau cacat permanen (Thanchomnang *et al.*, 2013). Pada kesepakatan global di tahun 2020 (*The Global Goal of Elimination of Lymphatic Filariasis as a Public Health Problem by The Year 2020*), *World Health Organization* menetapkan untuk mengeliminasi filariasis. Salah satu strategi eliminasi filariasis bukan hanya pada pemberian obat secara berkala namun harus juga memperkuat surveilans, jejaring laboratorium dan mengembangkan penelitian terkait filariasis (Kementerian Kesehatan RI, 2016).

Di Indonesia, kondisi penderita filariasis hanya ditemukan saat penyaringan awal yang dilakukan oleh petugas puskesmas dengan melihat kondisi fisik seperti kaki yang membengkak, demam saat malam hari dan belum pernah ditemukannya mikrofilaria menggunakan teknik mikroskopis. Dari hal tersebut, untuk menentukan apakah pasien benar terkena filariasis atau tidak, maka masih diperlukan adanya uji lanjutan setelah dilakukan tes mikroskopis. Dengan demikian, perlu pengembangan metode baru untuk diagnosis dalam mengidentifikasi dan mengkonfirmasi pemeriksaan mikrofilaria dan spesiesnya.

Identifikasi mikrofilaria yang sedang banyak dikembangkan yaitu menggunakan pelacak DNA dengan primer yang spesifik menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Di Negara Thailand, *B. malayi*, *B. pahangi* dan *D. immitis* pada sampel darah dapat diidentifikasi dengan *High Resolution Melting* (HRM) berbasis PCR *real-time*. Pada penelitian terdahulu, pemeriksaan PCR dengan HRM menggunakan primer spesifik yaitu SLX-F (5'GGAATCCCAGGTGTTGTAGACAT3') dan SLX-R (5'GGGCTGAAACATTCAATTACCTC 3'), dirancang dari gen *B. Malayi* 5S rRNA dan urutan SL1 (aksesi GenBank no D87037) yang memiliki kepekaan yang baik dalam mendeteksi DNA filariasis (Thanchomnang *et al.*, 2013). Menurut Aris *et al.*, (2013), pemilihan primer yang tepat sangat mempengaruhi kualitas deteksi molekuler berbasis PCR.

Terdapat komponen pengujian yang sangat penting dioptimalkan yakni pada tahap annealing untuk menentukan seberapa optimal primer menempel pada *template* DNA dengan uji spesifitas primer dan reagen (Siswanto *et al.*, 2019).

MATERIAL DAN METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan menguji spesifitas dari primer SLX menggunakan *real-time* PCR berbasis HRM berdasarkan pengamatan nilai *Cycle Threshold* (CT) melalui kurva amplifikasi. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer SLX sedangkan sampel dalam penelitian ini adalah kontrol positif, negatif dan hasil ekstraksi bakteri *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae* yang telah diekstraksi menggunakan DNA *Purification* dari PROMEGA.

• Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA bakteri sesuai dengan protokol dari PROMEGA. Terlebih dahulu ditambahkan 300 µl sampel ke dalam tabung mikrosentrifuge dan 900µl *lysis solution cell*. Kemudian diaduk lalu homogenkan. Selanjutnya, inkubasi selama 10 menit pada temperatur kamar, disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Lalu supernatant dibuang kemudian vortex pelletnya. *Nuclei lysis solution* ditambahkan dalam tabung untuk kemudian ditambahkan *protein precipitation solution* dan vortex selama 20 detik. Disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Supernatant dipindahkan ke tabung yang baru berisikan isopropanol, lalu ditambahkan isopropanol 300 µl. Campurkan *dicentrifuge* dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Supernatant dibuang kemudian dicampurkan 70% etanol sebanyak 300 µl, sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Selama 15 menit, tabung *tube* dimiringkan pada tisu. Kemudian ditambahkan DNA *rehydration solution* sebanyak 100 µl, kemudian diinkubasi pada *waterbath* selama 1 jam dengan suhu 65 °C.

• Real-time PCR

Proses selanjutnya dilakukan pemeriksaan *real-time* PCR berbasis HRM. Master *mix* PCR untuk HRM berisi 2x SensiFAST HRM *mix* 10 µL, 10 µL *Forward* Primer 0.8 µL, 10 µL *Reverse* Primer 0,8 µL, H₂O 16 µL. Sampel hasil ekstraksi bakteri (4 µL) ditambahkan ke dalam tabung berisi master *mix* tersebut. Sehingga total yang digunakan sebanyak 20 µL. Begitu juga dengan kontrol positif dan negatif. Kemudian *tube* PCR ditutup dengan penutupnya, kemudian dimasukkan ke dalam alat *PCRESCO Health Care*. Pada siklus PCR untuk memperoleh kurva HRM harus dijalankan pada kondisi siklus pra-inkubasi 2 menit pada suhu 95 °C, 40 siklus 95°C selama 5 detik (denaturasi), 60-65°C selama 10 detik (annealing), dan 72°C selama 5-20 detik (extension). Setelah reaksi selesai, dilakukan *melting curve* analisis. (Bioline, 2020).

HASIL

Pada pemeriksaan PCR, terlebih dahulu mengekstraksi sampel yang didapatkan dengan menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification* dari PROMEGA. Dari hasil ekstraksi DNA bakteri kemudian dilakukan kuantifikasi dengan menggunakan nanodrop. Hasil kuantifikasi DNA hasil Isolasi DNA bakteri disajikan pada Tabel 1.

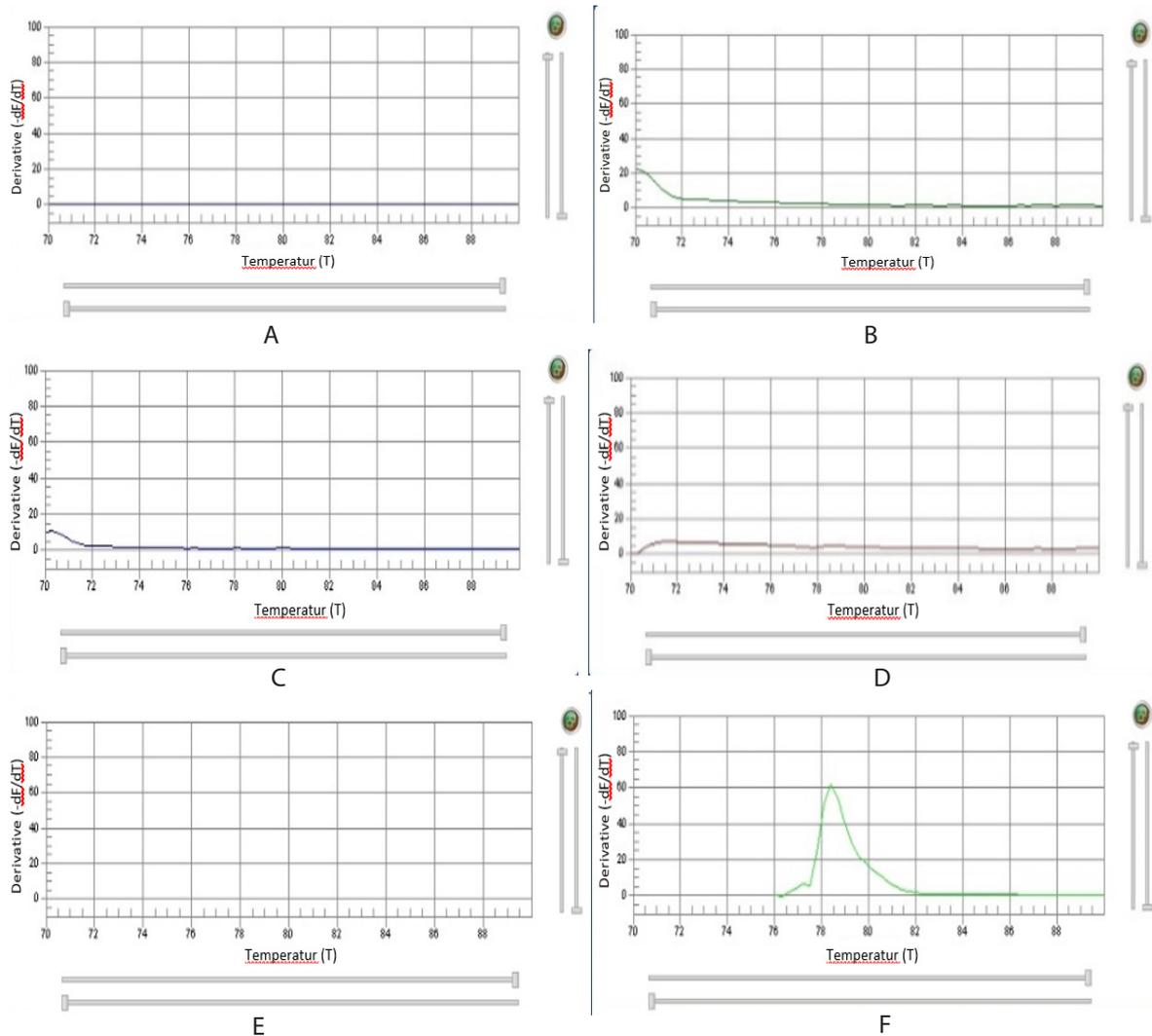
Hasil isolasi DNA menggunakan uji kuantifikasi dengan *spektrofotometer nanodrop*, DNA bakteri yang diekstraksi memiliki kisaran konsentrasi dari 31.9 ng/μl pada sampel 2 hingga 58.9 ng/μl sampel 1.

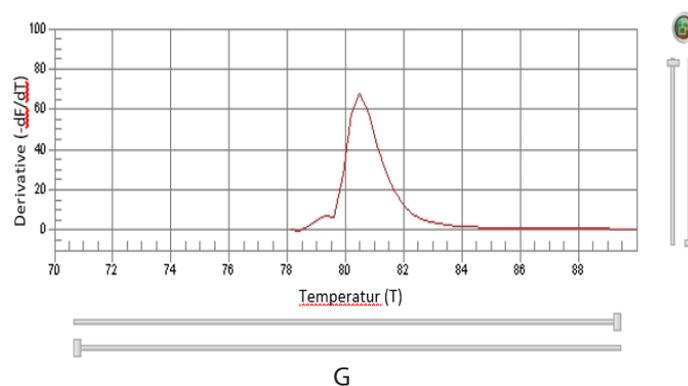
Pada metode ini, secara umum konsentrasi DNA yang diperoleh telah mencukupi untuk digunakan dalam kegiatan PCR. Hal ini sesuai rekomendasi KapaBiosystem yakni berkisar antara 10-100 ng/μl (Biosystems, 2017)

Tahapan berikutnya pada penelitian ini adalah uji spesifitas yang bertujuan menguji kelayakan reagen dan primer yang digunakan untuk membaca DNA yang telah diekstraksi seperti bakteri *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter clocae* dan kontrol negatif NTC (*Negative Temperature Coefficient*), kontrol positif *B.malayi* dan *W. bancrofti*.

Tabel 1. Rendemen pengeringan

Sampel	Konsentrasi DNA (ng/μL)	Kemurnian DNA (260 / 280)
Sampel 1 <i>Salmonella</i>	58.9	2.4
Sampel 2 <i>Klebsiella</i>	31.9	1.8
Sampel 3 <i>Pseudomonas</i>	32.3	2.0
Sampel 4 <i>Enterobacter clocae</i>	51.1	2.1





Keterangan: (A) Hasil uji spesifitas reagen dan primer menggunakan DNA bakteri *Salmonella*, (B) *Klebsiella*, (c) *Pseudomonas*, (d) *Enterobacter clocae*, (e) kontrol negatif NTC, (f) kontrol positif *B. malayi* dan (g) kontrol positif *W.bancrofti*.

Gambar 1. Hasil uji spesifitas

Hasil diatas menunjukkan bahwa reagen dan primer yang digunakan tidak dapat membaca DNA dari berbagai jenis bakteri. Hal tersebut dikarenakan hasil *melting curve* menunjukkan garis lurus seperti hasil dari kontrol negatif yang diartikan sebagai hasil negatif kemudian menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan kontrol positif *B. malayi* dan *W. bancrofti* dengan hasil *melting curve* 78.40 C dan 80.50 C. Dari hasil yang didapatkan maka dapat disimpulkan bahwa primer dan reagen yang digunakan spesifik hanya untuk membaca DNA filariasis *B. malayi* dan *W. bancrofti*.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengukuran nanodrop pada Tabel 1, menunjukkan bahwa nilai kemurnian DNA A260/A280 4 pada hasil isolasi bakteri berkisar dari 1,8 hingga 2.4. DNA yang memiliki nilai perbandingan A260/A280 kurang dari 1.8 menunjukkan memiliki tingkat kontaminasi oleh fenol atau senyawa lain yang ikut terbawa selama proses isolasi DNA berlangsung, sedangkan hasil kemurnian DNA yang memiliki nilai perbandingan lebih 2.0 tidak menunjukkan adanya kontaminasi (Scientific, 2011).

Hasil pengukuran nanodrop ini pun diperkuat oleh penelitian Dayati tahun 2019, yang menunjukkan bahwa hasil kemurnian menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification* dari PROMEGA menunjukkan tingkat kemurnian yang paling tinggi dari ketiga metode ekstraksi DNA yang diuji coba yaitu 1.83 (Dayanti *et al.*, 2019). Tingginya nilai kemurnian DNA merupakan hasil ekstraksi dengan kit isolasi DNA.

Untuk menghasilkan DNA murni, terdapat proses presipitasi dan pencucian yang berperan penting. Pada kit isolasi DNA, sebanyak tiga kali dilakukan proses presipitasi dan pencucian dengan penambahan isopropanol, *protein precipitation solution* dan etanol 70%. Hal tersebut dilakukan agar isolat DNA yang dihasilkan pada kit lebih murni serta dapat membuat perubahan struktur molekul DNA yang menyebabkan

terpresipitasi dari larutan dan senyawa debris. (Nurhayati and Darmawati, 2017).

Hasil penelitian pada Gambar 1, yakni uji spesifitas ini sama dengan penelitian (Rao *et al.*, 2006) yang menguji spesifitas alat dan reagen menggunakan berbagai macam mikroorganisme dengan tujuan ingin melihat apakah primer yang digunakan dapat membaca mikroorganisme lain selain mikrofilaria. Apabila dapat membaca selain mikrofilaria maka dapat dikatakan primer yang digunakan tidak spesifik (Rao *et al.*, 2006). Menurut penelitian (Siswanto *et al.*, 2019) menyatakan bahwa tahap uji spesifitas primer dan reagen adalah penting karena dapat menghindari dari resiko terjadinya hasil negatif palsu. Identifikasi mikrofilaria *B. malayi* dan *W. bancrofti* dapat menggunakan SLX.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa primer SLX yang akan digunakan memiliki spesifitas yang baik karena tidak dapat membaca sampel mikroorganisme lain selain mikrofilaria. Terbukti dengan uji spesifitas yang dilakukan spesifik membaca sampel yang mengandung mikrofilaria saja.

Rekomendasi dari penelitian ini adalah bahwa primer SLX sudah dapat digunakan untuk mengidentifikasi mikrofilaria dan dilanjutkan pada tahap berikutnya menggunakan sampel darah manusia yang terinfeksi oleh mikrofilaria.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PPM POLTEKKES KEMENKES BANTEN yang telah mendanai penelitian ini melalui Riset Penelitian Pemula dan semua pihak yang membantu dalam proses pengerjaan penelitian ini. Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak yang terkait dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aris, M., Sukenda, S., Harris, E., Sukadi, M.F., 2013. Molecular Identification of Pathogenic Bacteria and PCR Specific Primer Design. *e-Journal Budid. Perair.* 1, 43–50.
- Biosystems, K., 2017. KAPA2G Fast HotStart PCR Kit. v2.17.
- Dayanti, F.G., Djuminar, A., Dermawan, A., Tantan, A., 2019. Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Hasil Ekstraksi DNA Salmonella Typhi Menggunakan Metode Boiling, Naoh, Kit Komersial. *J. Ris. Ris. Kesehat. POLTEKKES DEPKES BANDUNG* 11, 350–357.
- Kementerian Kesehatan RI, 2016. Situasi Filariasis di Indonesia Tahun 2015, Oktober Bu. ed. Pusat Data Informasi Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Nurhayati, B., Darmawati, S., 2017. *Biologi Sel dan Molekuler: Bahan Ajar Teknologi Labotarium Medis*, 1st ed. Indo.Kemkes.BPPSDM, Jakarta.
- Rao, R.U., Weil, G.J., Fischer, K., Supali, T., Fischer, P., 2006. Detection of Brugia Parasite DNA in Human Blood by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3887–3893.
- Santoso, S., Suryaningtyas, N.H., 2015. Spesies Mikrofilaria pada Penderita Kronis Filariasis secara Mikroskopis dan Polymerase Chain Reaction (PCR) di Kabupaten Tanjung Jabung Timur. *Media Penelit. dan Pengemb. Kesehat.* 25, 249–256.
- Scientific, T., 2011. Assessment of Nucleic Acid Purity, T042 Technical Bulletin, NanoDrop Spectrophotometers. Wilmington, DE, USA Thermo Fish. Sci.
- Siswanto, Y.P., Merdekawati, F., Ernawati, E., Hardiana, A.T., Kurniawan, E., 2019. Optimasi Suhu Annealing dan Konsentrasi Primer Untuk Deteksi Brugia Malayi Menggunakan Real-Time PCR. *J. Ris. Kesehat. Poltekkes Depkes Bandung* 11, 314–321.
- Thanchomnang, T., Intapan, P.M., Tantrawatpan, C., Lulitanond, V., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., Kaewkong, W., Sanpool, O., Janwan, P., Choochote, W., Maleewong, W., 2013. Rapid Detection and Identification of Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. pahangi, and Dirofilaria immitis in Mosquito Vectors and Blood Samples by High Resolution Melting Real-Time PCR. *Korean J. Parasitol.* 51, 645–650.