

## JURNAL METAMORFOSA

### Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

#### Perbandingan Tiga Metode Isolasi DNA *Asperigilus niger*

#### Comparison of Three DNA Isolation Methods of *Aspergillus Niger*

Adyan Donastin<sup>1</sup>, Maharani Pertiwi Koentjoro<sup>2\*</sup>, Muhamad Taufik Hidayat<sup>3</sup>, Endry Nugroho Prasetyo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya, Jl. Jemursari No. 51-57, Surabaya

<sup>2</sup>Program Studi D4 Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya

<sup>3</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember

\*Email: [maharani@unusa.ac.id](mailto:maharani@unusa.ac.id)

#### INTISARI

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) menjadi teknik yang diaplikasikan untuk mendeteksi dan menguji keberadaan materi genetik dari jamur patogen. Metode ini selanjutnya banyak dikembangkan karena memiliki sensitivitas yang tinggi dibanding dengan metode kultur dalam mendeteksi keberadaan jamur patogen. Untuk melakukan pengujian berbasis PCR yang sensitif, spesifik, dan andal, ketersediaan DNA murni serta protokol ekstraksi DNA yang mudah dilakukan sangat penting. Saat ini, protokol untuk ekstraksi DNA yang ada pada umumnya memerlukan kit khusus dan dengan tambahan enzim. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membandingkan kuantitas dan kualitas hasil isolasi DNA *Aspergillus niger* dengan tiga metode yang berbeda. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi kultur murni *A. niger* dan isolasi total DNA menggunakan tiga metode, yaitu protokol sesuai pada instruksi Wizard® Genomic DNA Purification Kit (P1), Modifikasi Wizard® Genomic DNA Purification Kit (P2) dan Monarch Genomic DNA Purification Kit NEB (P3). Hasil evaluasi isolasi DNA melalui spektrofotometer pada panjang gelombang  $A_{260/280}$  nm menunjukkan rasio ~1.4, ~1.8, dan ~1.7 pada P1 dan P2, dan P3 berturut-turut. Kuantitas yang didapat berkisar antara 210 sampai 305 ng/ $\mu$ L. Hasil DNA total didapat selanjutnya digunakan untuk uji PCR fragmen DNA ribosom daerah ITS menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Pengamatan elektroforosis hasil PCR menunjukkan semua sampel menghasilkan pita dengan panjang ~500 bp. Hasil isolasi DNA pada metode P1 tidak menunjukkan pita pada gel agarose, tetapi dapat terlihat pada produk PCR. Metode P2 dan P3 menunjukkan DNA yang memiliki kualitas dan kualitas yang baik. Metode P2 dan P3 menggunakan teknik penghancuran sel dengan nitrogen cair dan kombinasi penambahan proteinase K. Protokol yang didapatkan diharapkan memberikan informasi metode yang cepat dan baik dalam isolasi DNA total dari *A. niger*.

**Kata kunci:** *Aspergillus niger*, Isolasi DNA, ITS1, ITS4

#### ABSTRACT

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) is a technique that is applied to detect and test the presence of genetic material from pathogenic fungi. This method was further developed because it has a high sensitivity compared to the culture method in detecting the presence of pathogenic fungi. To perform sensitive, specific and reliable PCR-based assays, the availability of pure DNA as well as an easy-to-

perform DNA extraction protocol is essential. Currently, existing protocols for DNA extraction generally require specialized kits and with the addition of enzymes. Therefore, this study was conducted to compare the quantity and quality of *Aspergillus niger* DNA isolation with three different methods. The stages of the research carried out included pure *A. niger* culture and total DNA isolation using three methods, namely the protocol according to the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (P1) instructions, Modified Wizard® Genomic DNA Purification Kit (P2) and Monarch Genomic DNA Purification Kit NEB (P3). The results of the evaluation of DNA isolation using a spectrophotometer at a wavelength of A260/280 nm showed a ratio of 1.4, 1.8, and 1.7 at P1 and P2, and P3 respectively. The quantity obtained ranged from 210 to 305 ng/μL. The total DNA results obtained were then used for PCR testing of ITS ribosomal DNA fragments using ITS1 and ITS4 primers. Electrophoresis observation of PCR results showed that all samples produced bands with a length of 500 bp. The results of DNA isolation in the P1 method did not show bands on the agarose gel, but could be seen in the PCR product. Methods P2 and P3 showed DNA that had good quality and quality. The P2 and P3 methods use a cell destruction technique with liquid nitrogen and a combination of addition of proteinase K. The obtained protocol is expected to provide fast and good method information in the isolation of total DNA from *A. niger*.

**Keyword:** *Aspergillus niger*, total DNA isolation, ITS1, ITS4

## PENDAHULUAN

Analisis keberadaan jamur patogen berbasis DNA belum secara luas digunakan di laboratorium medik. Analisis berbasis DNA dapat diaplikasikan antara lain untuk mendeteksi jamur patogen, seperti anggota dari genus *Aspergillus*, yaitu *Aspergillus fumigatus* (Sabino *et al.*, 2020) dan *Aspergillus niger* (Gautam *et al.*, 2011). *Aspergillus* termasuk dalam jamur berfilamen yang lebih sering dikaitkan dengan infeksi jamur invasif. Firacative *et al.*, (2020) menyebutkan lebih dari 30 juta pasien berisiko terkena aspergillosis. Aspergilosis merupakan infeksi yang disebabkan oleh sejenis kapang (jamur). Pada beberapa pasien, spora jamur ini dapat memicu reaksi alergi. Kondisi alergi ini dapat meningkat menjadi infeksi yang serius dengan penyebaran ke pembuluh darah dan sekitarnya. Kondisi ini disebut sebagai aspergillosis invasif

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan prosedur utama yang digunakan untuk mendeteksi infeksi patogen, seperti genus *Aspergillus* (Sabino *et al.*, 2020). Teknik ini memiliki kelebihan dibanding dengan metode konvensional, yaitu kultur jamur dan identifikasi secara makroskopis atau mikroskopis. Metode konvensional memiliki kelemahan diantaranya membutuhkan waktu yang panjang dalam pengerjaan dan faktor

subyektifitas dalam pengamatan secara makroskopis maupun mikroskopis dapat menimbulkan bias. Hasil kajian *Systematic Review* yang dilakukan oleh White *et al.*, (2015) menyebutkan bahwa deteksi PCR untuk *Aspergillus* memiliki sensitifitas dengan persentasi 75–94.5%. Waktu pengerjaan deteksi *Aspergillus* menggunakan teknik PCR relative lebih cepat dan sangat direkomendasikan bagi pasien yang berada pada kondisi darurat untuk penanganan.

Metode PCR membutuhkan cetakan DNA hasil isolasi dengan kualitas baik dan jumlahnya cukup untuk reaksi amplifikasi (Gupta, 2019). Apabila kualitas cetakan DNA rendah dan jumlahnya kurang, maka metode PCR akan menjadi tidak efektif dalam mendeteksi sekuens gen target *Aspergillus*. Seringkali, metode isolasi yang kurang tepat akan menghasilkan DNA yang berkualitas minimal (Dilhari *et al.*, 2020). Beberapa kit isolasi DNA yang dijual di pasaran, pada umumnya fokus kepada isolasi DNA dari bakteri atau sel tumbuhan. Sedangkan jamur memiliki lapisan dinding sel yang terbuat dari kitin, berbentuk kaku, berlapis, dan struktur kompleks. Dinding sel jamur berfilamen terdiri dari selongsong mikrokristalin bagian dalam kitin [poli-β-(1→4)-N-asetilglukosamin]. Struktur ini menyebabkan dinding sel jamur kompleks dan

membuatnya tahan terhadap metode lisis yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA jamur (Qiao *et al.*, 2020).

Ketersediaan metode ekstraksi DNA jamur yang efektif dan efisien akan sangat membantu dalam analisis PCR dan mengurangi waktu pengerjaan. Oleh karena itu, Tujuan penelitian ini adalah untuk merancang sebuah protokol yang murah, cepat dan efisien untuk isolasi DNA dengan kemampuan mendapatkan kualitas DNA total yang baik dapat digunakan sebagai cetakan analisis PCR. Penelitian ini membandingkan metode–metode yang cepat, mudah dan sensitif untuk mengisolasi DNA dari spesies *Aspergillus*

yaitu *A. niger*. DNA hasil isolasi selanjutnya diuji kualitas dan kuantitasnya. Metode yang didapatkan diharapkan dapat dijadikan sebagai protokol isolasi DNA untuk sampel *A. niger* di laboratorium medis.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian bersifat eksperimen dan studi komparatif perbandingan metode isolasi DNA dari sampel *A. niger*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, UNUSA.

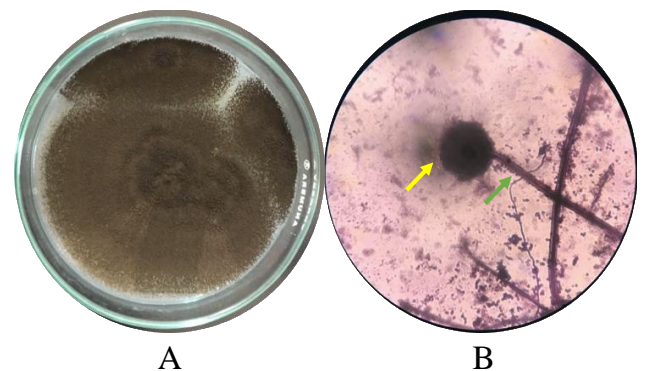
### Kultur *Aspergillus niger*

Isolat *A. niger* diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Isolat disub–kultur pada media potato dextrose agar (PDA). Kultur diinkubasi pada suhu 26–28°C selama 10 hari. Pengamatan makroskopik diamati setiap 2 hari sekali. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan mengambil satu ose hifa ke dalam larutan lactophenol cotton–blue di kaca preparat. Hasil koloni subkultur yang tumbuh setelah 5 hari digunakan untuk isolasi DNA (Gambar 1).

### Isolasi DNA

Isolasi total genom *A. niger* menggunakan 3 metode. Gambar 2 menyajikan diagram alir proses isolasi DNA. Metode pertama (P1) berdasarkan pada pedoman di *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega 2010). Isolasi dilakukan melalui beberapa tahap, pertama pelet sel jamur sebanyak 40 mg dimasukkan dalam mortar steril dan

ditambahkan nitrogen cair untuk proses lisis sel (digerus dengan *pestle*). Serbuk sel kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube steril ukuran 1.5 mL lalu ditambahkan 120 µL EDTA 0.5 M (pH 8) dan 500 µL *Nuclei Lysis Solution*. Sampel dinkubasi selama 45 menit pada suhu 65°C, kemudian 3 µL *RNase solution* ditambahkan dan mikrotube dibolak–balik. Sampel diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 37°C dan *Protein Precipitation Solution* ditambahkan sebanyak 200 µL ke dalam suspensi. Sampel divortex 20 detik lalu didinginkan di atas es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi selama 4 menit pada 10,000 rpm, kemudian supernatan dipindahkan ke mikrotube baru serta 600 µL Isopropanol tambahkan dan mikrotube dibolak–balik. Sampel disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 10,000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 µL Ethanol 70%. Sampel disentrifugasi kembali selama 5 menit pada 10,000 rpm. Supernatan dibuang dan dikering–anginkan (~ 1 jam). Pelet selanjutnya ditambah dengan 100 µL *DNA Rehydration Solution*. Tahap terakhir, sampel diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65°C. Pelet DNA akan diuji kualitas dan kuantitatifnya.

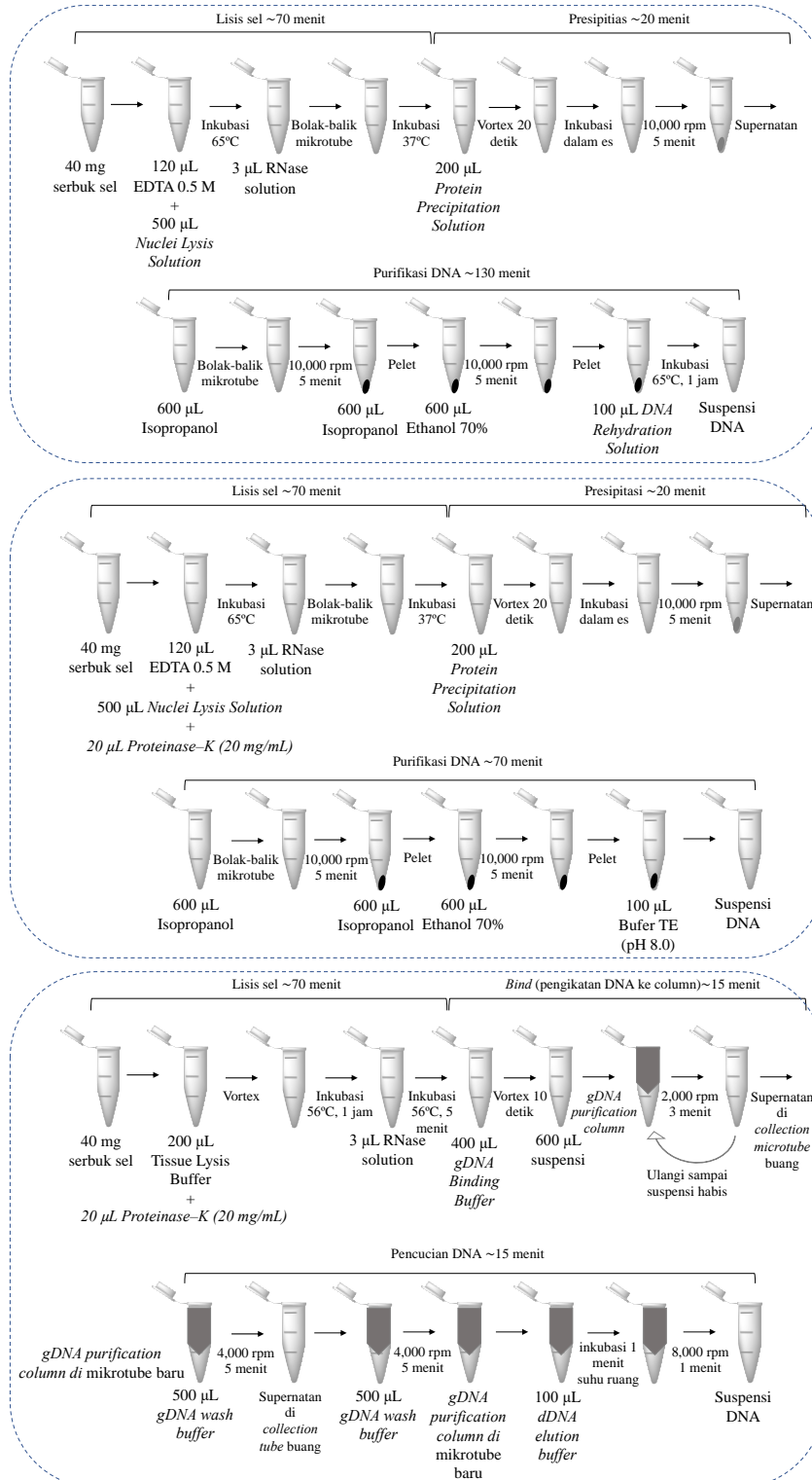


**Gambar 1.** A. Spesies *Aspergillus niger* pada media potato dextrose agar (PDA) setelah 5 hari inkubasi. Koloni pada media PDA berwarna hitam; B. Pengamatan konidia (panah kuning) dengan konidiofor (panah hijau) *A. niger* pada perbesaran 40X.

Metode kedua (P2) adalah modifikasi dari pedoman di *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega 2010). Tahap pertama, pelet sel jamur sebanyak 40 mg

ditambahkan dengan nitrogen cair, dan digerus dengan mortar steril. Serbuk sel kemudian dimasukkan dalam mikrotube steril ukuran 1.5 mL lalu ditambahkan 120 µL EDTA 0.5 M (pH

8), 500 µL *Nuclei Lysis Solution*, dan 20 µL *Proteinase-K* (20 mg/mL).



**Gambar 2.** Diagram alur isolasi DNA dengan metode P1, P2 dan P3. Sampel diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60°C, kemudian sebanyak 3 µL *RNase solution* ditambahkan dan dibolak-balik. Sampel diinkubasi kembali selama 20 menit

pada suhu 37°C dan *Protein Precipitation Solution* ditambahkan sebanyak 200 µL. Sampel divortex 20 detik lalu didinginkan dalam es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi 4 menit pada 10,000 rpm, kemudian supernatan dipindahkan ke mikrotube baru serta isopropanol ditambahkan sebanyak 600 µL dan dibolak-balik. Sampel disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10,000 rpm. Supernatan dibuang dan Ethanol 70% ditambahkan sebanyak 600 µL. Sampel disentrifugasi kembali selama 10 menit pada 10,000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet dikering-aanginkan (~ 1 jam). Pelet selanjutnya ditambahkan 100 µL Bufer TE (pH 8.0) dan disimpan dalam -20°C.

Metode ketiga (P3) berdasarkan kit dari *Monarch Genomic DNA Purification Kit NEB* (Cat. T3010). Sebanyak 40 mg sampel dimasukkan dalam mortar dan ditambahkan nitrogen cair. Sampel digerus dengan *pestle*. Serbuk sel kemudian dipindah ke dalam mikrotube steril dan *Tissue Lysis Buffer* ditambahkan sebanyak 200 µL. Selanjutnya, Proteinase-K (20 mg/mL) ditambahkan sebanyak 20 µL. Suspensi divortex dan diinkubasi dalam 56°C selama 1 jam. Suspensi ditambahkan 3 µL RNase dan diinkubasi pada 56°C selama 5 menit. Tahap berikutnya adalah suspensi sel ditambahkan *gDNA Binding Buffer* sebanyak 400 µL dan divortex selama 10 detik. Sebanyak 600 µL suspensi dimasukkan ke dalam *gDNA purification column* dan disentrifus pada 2,000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang berada dalam *collection mikrotube* dibuang dan sisa suspensi kemudian dimasukkan ke dalam *gDNA purification column* serta disentrifus kembali pada 2,000 rpm selama 3 menit. *gDNA purification column* kemudian dipindahkan ke tube baru dan ditambahkan 500 µL *gDNA wash buffer*. Tube kemudian di sentrifus pada 4,000 rpm selama 5 menit. Supernatan pada *collection mikrotube* kemudian dibuang dan *column* di usap dengan tissue. *Column* kemudian ditambahkan kembali dengan 500 µL *gDNA wash buffer* dan di sentrifus pada 4,000 rpm selama 5 menit. *Column* kemudian ditempatkan di mikrotube baru dan di tambahkan 100 µL *ddDNA elution*

*buffer* dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Mikrotube selanjutnya disentrifus pada 8,000 rpm selama 1 menit, pada suhu 4°C. Hasil isolasi DNA selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis dalam 0.8 % agarose gel dan 1X Buffer TAE. Elektroforesis (MUPID-exU) dijalankan pada 100 Volts, selama 50 menit. Gel selanjutnya di rendam dalam Ethidium Bromida (7 µL/100 mL TAE 1X). Gel diamati pada mesin UV-UV Transiluminator TI2621D (Pacific Image).

### Analisis kualitatif DNA *A. niger*

Semua sampel disimpan pada suhu -20°C. Hasil isolasi kemudian di ukur kualitas dan kuantitasnya menggunakan metode spektrofotometri menggunakan Biophotometer Spectrophotometer Genesys 10S Uv-Vis. Setiap DNA hasil isolasi di uji pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dan dihitung rasionya. Nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  dapat membantu mengevaluasi tingkat kontaminasi protein dalam DNA yang dimurnikan. Selanjutnya, konsentrasi DNA dihitung dengan rumus  $[DNA] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$ .

### Amplifikasi dan optimasi kondisi PCR

Amplifikasi gen target *A. niger* dilakukan menggunakan primer Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Al-Mutarrafi *et al.*, 2019). Komponen PCR dalam satu reaksi sampel memiliki total volume 25 µL yang terdiri atas 2.5 µL DNA sampel hasil isolasi, 12.5 µL GoTaq® Green Master Mix, masing-masing primer 1 µL dan Nuclease Free Water sebanyak 8 µL. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan temperatur PCR 94°C–1 menit (denaturasi), 58°C–1 menit (annealing), 72°C–1 menit (elongasi). Pada akhir siklus, proses elongasi diperpanjang selama 10 menit. Hasil PCR selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis dalam 2% agarose gel dan 1X Buffer TAE.

### Elektroforesis gel agarose produk PCR

Hasil PCR dimasukan dalam sumuran 2% gel agarose sebanyak 10 µL yang ditambahkan

2  $\mu\text{L}$  loading dye 6X (Komposisi yaitu 10 mM Tris, 0.03% Bromophenol blue, 60% gliserol, 60 mM EDTA pH 7.6). Sebagai penanda (Marker) digunakan ladder 100 bp (Promega). Elektroforesis dijalankan dengan kondisi tegangan 110 V selama 35 menit. Gel selanjutnya diwarnai dengan 10 mg/mL Etidium bromide dan diamati menggunakan UV transilluminator.

## HASIL

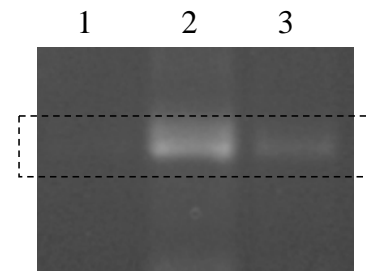
Hasil analisis kualitas dan kuantitas DNA pada setiap metode disajikan pada Tabel 1. Pengukuran rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) digunakan sebagai penduga kemurnian atau kualitas DNA. Kualitas DNA hasil isolasi metode P1 berada nilai  $\sim 1.4$  (duplo). Nilai ini dibawah standar purifikasi yaitu lebih besar dari 1.5 dan idealnya berada pada kisaran 1.8. Metode P2 dan P3 memiliki kualitas yang cukup baik, karena berada di kisaran 1.8 (Moore *et al.*, 2004; Green dan Sambrook, 2018). Hasil uji kualitatif yang tertinggi diperoleh dari metode P2, dengan konsentrasi DNA total sampel 305 ng/ $\mu\text{L}$ .

**Tabel 1.** Hasil analisis kuantitatif dan kualitatif DNA total metode isolasi DNA *A. niger*

Metode	A260	A280	$A_{260}/A_{280}$	Konsentrasi ng/ $\mu\text{L}$ *
P1	0.42	0.30	1.4	210
P2	0.61	0.33	1.8	305
P3	0.59	0.34	1.7	295

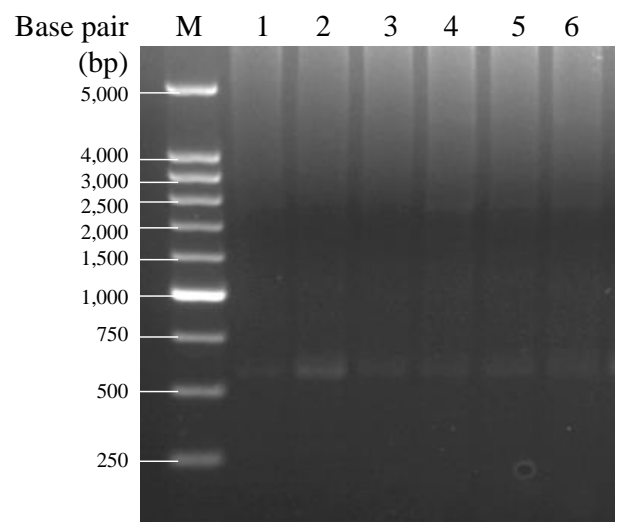
\*Faktor pengenceran 10

Visualisasi kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa disajikan pada Gambar 3. Pada kolom 1 menunjukkan hasil isolasi DNA menggunakan metode P1. Masing-masing dari sampel di loading sebanyak 5  $\mu\text{L}$ . Pada analisis elektroforesis ini, pita yang muncul sangat tipis sekali. Sedangkan pada kolom 3 dan 4 (metode P2) dan kolom 5 dan 6 (metode P3) nampak pita, dimana pada baris 2 terlihat jelas. Hasil ini sesuai dengan uji kualitatif dan kuantitatif DNA menggunakan metode spektrofometer, yaitu metode P2 menghasilkan rasio absorbansi  $A_{260}/A_{280}$  sebesar  $\sim 1.4$  dan konsentrasi 305 ng/ $\mu\text{L}$ .



**Gambar 3.** Elektroforesis fragmen DNA ribosom ITS *A. niger* yang diisolasi menggunakan metode P1 (baris 1), P2 (baris 2) dan P3 (baris 3). Volume sampel DNA *A. niger* tiap sumuran 5  $\mu\text{L}$ .

Untuk mengkonfirmasi kualitas sampel DNA yang diekstraksi dan pengaruh adanya kontaminan pada sampel DNA, maka analisis PCR dilakukan menggunakan primer universal untuk jamur (ITS1 dan ITS4). Hasil elektroforesis pada Gambar 4 menunjukkan bahwa sampel DNA hasil isolasi metode P1, P2 dan P3 mampu menghasilkan amplifikasi potongan DNA dengan panjang  $\sim 500$  bp. Kisaran panjang ini diperoleh dari desain primer yang digunakan memotong DNA di panjang  $\sim 500$  bp. Daerah ITS merupakan target efektif untuk analisis filogenetik pada jamur, di wilayah ITS ini panjang urutan basa bervariasi antara isolat yang berbeda dari spesies yang sama (Gomes *et al.*, 2002; Krimitzas *et al.*, 2013).



**Gambar 4.** Hasil elektroforesis produk amplifikasi PCR menggunakan primer ITS1 dan

ITS4 yang diekstraksi menggunakan metode P1 (kolom 1 dan 2), P2 (kolom 3 dan 4) dan P3 (baris 5 dan 6) pada gel agarosa 2 % dengan kisaran ~500 bp. M: Penanda berat molekul 250 bp (Genesta™ DNA Ladder).

## PEMBAHASAN

Genus *Aspergillus* dicirikan dengan bentuk selnya yang berfilamen (hifa), bercabang dan memiliki konidiofora yang muncul dari foot cell (miselium yang membengkak dan berdinding tebal). Penyebaran jamur ini umumnya melalui konidia yang terbang dengan bantuan angin. Genus *Aspergillus* terdiri dari beberapa ratus spesies dan beberapa diantaranya menyebabkan penyakit termasuk infeksi lokal, penyakit fatal dan respons alergi, jika konidianya terhirup pada manusia. *A. niger* merupakan anggota dari genus *Aspergillus* yang diketahui menyebabkan alergi hingga infeksi saluran pernafasan (Paulussen *et al.*, 2016; Merad *et al.*, 2018).

Deteksi infeksi *Aspergillus* di laboratorium medik dilakukan dengan beberapa metode seperti uji serologi antibodi (Richardson *et al.*, 2018), metode kultur (pengamatan makroskopik dan mikroskopik) (McClenny *et al.*, 2005), dan metode deteksi materi genetik asam nukleat (Barnes *et al.*, 2016). Metode serologi antibodi memiliki keunggulan mudah dilakukan di laboratorium, tetapi sensitivitas dan spesifitasnya rendah (Richardson *et al.*, 2018). Metode kultur adalah metode konvensional yang saat ini masih digunakan, karena peralatan yang dibutuhkan sederhana dan media pertumbuhan yang murah. Tetapi, metode ini memiliki kekurangan, yaitu membutuhkan waktu kultur yang panjang, optimasi media pertumbuhan untuk mengamati pembentukan konidiofor dan faktor subjektifitas bagi analisis kesehatan membuat metode ini tidak tepat digunakan untuk identifikasi cepat infeksi *Aspergillus* (McClenny *et al.*, 2005).

Metode deteksi cepat berbasis molekuler telah lama dikembangkan untuk mengenali spesies *Aspergillus*. Metode ini mengandalkan deteksi basa nukleat melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Melalui PCR, DNA dari jamur akan diamplifikasi oleh primer spesifik

dan akan di visualisasi. Metode ini terbukti efektif dan efisien dalam mendeteksi *Aspergillus* dan sangat tepat digunakan pada penderita yang mengalami immunodepresan atau alergi akut (Barnes *et al.*, 2018).

Langkah penting yang harus diperhatikan dalam metode PCR adalah kualitas dan kuantitas *template* atau cetakan DNA (Gupta, 2019). DNA harus memiliki kualitas yang baik dan kuantitas yang cukup agar proses PCR dapat berjalan dengan optimal. Oleh karena itu, metode isolasi DNA memiliki peran penting dalam memperoleh DNA yang murni, dengan kontaminan sesedikit mungkin (Vidic *et al.*, 2019).

Secara garis besar, metode P1, P2 dan P3 terdiri atas tiga langkah dasar ekstraksi DNA yaitu 1) lisis sel, 2) *precipitation* (pengendapan,) dan 3) pemurnian (Ali *et al.*, 2017). Lisis sel merupakan tahapan dimana sel dan nukleus dipecah untuk melepaskan DNA di dalamnya. Pada metode ini, lisis sel utamanya menggunakan metode penambahan nitrogen cair. Sel yang telah lisis menyebabkan isi sel keluar menjadi satu dalam suspensi. Sehingga tahap selanjutnya yang dilakukan adalah pengendapan molekul-molekul seluler. Selanjutnya, alkohol (seperti etanol atau isopropanol) ditambahkan yang menyebabkan DNA mengendap. Hal ini disebabkan, DNA tidak dapat larut dalam alkohol. Pada tahap ketiga, DNA dipisahkan dari fase air dengan sentrifugasi. DNA kemudian dibilas dengan alkohol dengan konsentrasi lebih rendah (70%) untuk menghilangkan sisa bahan yang tidak diinginkan dan sisa molekul seluler. Pada titik ini DNA yang dimurnikan biasanya dilarutkan kembali dalam fase cair untuk memudahkan penanganan dan penyimpanan (Thatcher, 2015; Qiao *et al.*, 2020).

Pada penelitian yang ini dilakukan, metode isolasi DNA P1, P2 dan P3 menggunakan kit komersial yang dimodifikasi sesuai dengan kondisi di laboratorium. Langkah-langkah kunci dari protokol yang dimodifikasi adalah: (1) penggunaan enzim proteinase-K. (2) lamanya waktu inkubasi dari 60 menit ke 45 menit (3) kecepatan dan waktu proses sentrifugasi dan (4) buffer yang

digunakan dalam rehidrasi pelet DNA. Elektroforesis gel DNA menunjukkan pola pita yang menunjukkan bahwa DNA tidak mengalami degradasi. Isolasi DNA pada semua protokol ini menggunakan nitrogen cair untuk lisis sel.

Metode P2 menghasilkan sejumlah besar DNA yang murni dan dapat digunakan untuk proses PCR. Pada metode ini, Proteinase-K digunakan sebagai bahan tambahan untuk membantu proses lisis sel. Hasil ini sejalan dengan penelitian Goldschmidt *et al.*, (2014) yang menyebutkan bahwa Proteinase-K dapat membantu proses pelisisan sel dengan melarutkan protein seluler.

Metode P1 walaupun tidak tervisualisasi pada proses elektroforesis setelah isolasi, tetapi dapat menghasilkan potongan DNA hasil PCR. Hal ini dapat disebabkan konsentrasi DNA tidak mampu tervisualisasi oleh pewarna *Ethidium bromide*, tetapi dapat di amplifikasi pada proses PCR. Umumnya konsentrasi DNA yang digunakan dalam proses PCR adalah 100-250 ng untuk DNA genom eukariot per 50µl reaksi (Lorenz *et al.*, 2012).

Isolasi DNA dari jamur sedikit berbeda dengan isolasi DNA dari sel bakteri atau manusia. Jamur memiliki dinding sel yang tersusun dari kitin (polimer dari  $\beta$ -1,4 GlcNAc) yang membuatnya sulit untuk dilisiskan (van Leeuwe *et al.*, 2020). Oleh karena itu, evaluasi metode isolasi DNA perlu dilakukan untuk mendapatkan protokol yang efektif dan efisien dalam memperoleh DNA yang murni.

PCR yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan primer universal ITS 1 dan ITS4. Primer ini telah secara luas digunakan dalam analisis ITS-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), yaitu alat molekuler yang berguna dalam skrining polimorfisme nukleotida di antara isolat *A. flavus* (Zarrin and Erfaninejad, 2016).

## KESIMPULAN

Aplikasi teknik PCR untuk diagnosis aspergillosis invasif memerlukan DNA murni. Metode P2, yaitu penggunaan kit komersial Wizard® Genomic DNA Purification Kit dengan modifikasi penambahan Proteinase-K

mampu mendapatkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang memadai untuk proses PCR. Metode ini memiliki kecepatan lebih baik dibanding dengan metode yang lain. Namun demikian, studi lebih lanjut dengan sampel klinis mungkin diperlukan untuk memvalidasi metode ini sebagai uji isolasi DNA.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya telah mendanai penelitian ini melalui hibah Riset Internal LPPM UNUSA Tahun 2021.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mutarrafi, M., N.T. Elsharawy, A. Al-Ayafi, A. Almatrafi, H. Abdelkader 2019. Molecular identification of some fungi associated with soft dates (*Phoenix dactylifera* L.) in Saudi Arabia. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 7(4): 97-106.
- Ali, N., R. Rampazzo, A. Costa, M. Krieger. 2017. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Research International*. 2017: doi: 10.1155/2017/9306564.
- Barnes, R.A., P.L. White. 2016. PCR technology for detection of invasive Aspergillosis. *Journal of Fungi* (Basel), 2(3): 23-27.
- Barnes, R.A., P. L. White, C.O. Morton, T.R. Rogers, M. Cruciani, J. Loeffler, J.P. Donnelly. 2018. Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips. *Medical Mycology*. 56(1): 60-72
- Dilhari, A., A. Sampath, C. Gunasekara, N. Fernando, D. Weerasekera, C. Sissons, A. McBain, M. Weerasekera. 2020. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *AMB Express*. 7(1):179-184.



- C. Firacative. 2020. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 115: e200430.
- Gautam, A.K., S. Sharma, S. Avasthi, R. Bhadauria, 2011. Diversity of fungi and mycotoxins associated with stored triphala churn and its ingredients. *Journal of Biological Sciences*. 11: 226–235.
- Goldschmidt, P., S. Degorge, L. Merabet, C. Chaumeil. 2014. Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PLoS One*. 9(6): doi: 10.1371/journal.pone.0094886.
- Gomes, E.A., C.M.M. Kasuya, E.G. de Barros, A.C. Borges, E.F. Araújo, 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*. 25:477–483.
- Green, M. R., J. Sambrook. 2018. Isolation and Quantification of DNA. Cold Spring Harb Protoc, doi:10.1101/pdb.top093336.
- Gupta, N., 2019. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*. 36(2): 116–117.
- Krimitzas, A., I. Pyrri, V. N. Kouvelis, E. Kapsanaki-Gotsi, M. A. Typas. 2013. A phylogenetic analysis of Greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *Microbial Diversity for Biotechnology*. 2013: <https://doi.org/10.1155/2013/260395>.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63: 3998.
- McClenny, N., 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology*. 43(1): 125–128.
- Merad, Y., H. Adjmi-Hamoudi, F.Z.S. Merad, S. Djeriou. 2018. Otomycosis in the fisherman community: A survey at Bénisaf harbour, Ain Témouchent, Algeria. *Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences*. 6: 118–120.
- Moore, E., A. Arnscheidt, A. Kruger, C. Strompl, M. Mau 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 1(1): 3-18.
- Mousavi, B., M.T. Hedayati, N. Hedayati, M. Ilkit, S. Syedmousavi. 2016. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Current Medical Mycology*. 2(1): 36-42.
- Qiao, Z., H. Liu, G.S. Noh, B. Koo, Q. Zou, K. Yun, Y. O. Jang, S. H. Kim, Y. Shin. 2020. A Simple and Rapid Fungal DNA Isolation Assay Based on ZnO Nanoparticles for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Micromachines* (Basel). 11(5): 515-520.
- Paulussen, C., J. E. Hallsworth, S. Alvarez-Perez, W. C. Nierman, P. G. Hamill, D. Blain, H. Rediers, B. Lievens. 2016. Microbial biotechnology special issue invitation on ‘biotechnological potential of eurotiale fungi’ – minireview. *Microbial Biotechnology*. 10(2): 1-26.
- Richardson, M., I. Page, 2018. Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections. *Current Fungal Infection Reports*. 12(3): 127-136.
- Sabino, R., H. Simoes, C. Verissimo, 2020. Molecular Detection of *Aspergillus*: Application of a Real-Time PCR Multiplex Assay in Tissue Samples. *Journal of Fungi*. 6(11): 2–7.
- Thatcher, S. A. 2015. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical Chemistry*. 61(1): 89-99.
- van Leeuwe, T. M., M. Arentshorst, P. J. Punt, A. F. J. Ram. 2020. Interrogation of the cell wall integrity pathway in *Aspergillus niger* identifies a putative negative regulator of transcription involved in chitin deposition. *Gene* X, 5: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.100028>.

- Vidic, J., P. Vizzini, M. Manzano, D. Kavanaugh, N. Ramarao, M. Zivkovic, V. Radonic, N. Knezevic, I. Giouroudi, I. Gadjanski. 2019. Point-of-Need DNA testing for detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors* (Basel, Switzerland). 19(5): 1100.
- White, P.L., J.R. Wingard, S. Bretagne, J. Löffler, T.F. Patterson, M.A. Slavin, R.A. Barnes, P.G. Pappas, J.P. Donnelly. 2015. *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clinical Infectious Diseases*. 61(8): 1293–1303.
- Zarrin, M., M. Erfaninejad. 2016. Molecular variation analysis of *Aspergillus flavus* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer rDNA region. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 12: 1628-1632.