

Analisis Perbandingan Kualitas Produk Amplikon Gen PMSA-2 Antara Spesimen Spot Darah Kering dan Vena

ARSYAM MAWARDI^{1*}, HENDRA K. MAURY¹, YUSTINUS MALADAN²

¹Program Studi Biologi, Fakultas MIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

²Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Balitbangkes) Papua

Diterima: 13 Agustus 2019 – Disetujui: 22 Desember 2019

© 2020 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

This study is aimed to analyze the comparative quality of PMSA-2 gene amplicon product stability from two different specimen sources, spot specimens of dried blood and venous blood, as well as selecting the best storage method for specimens of blood samples. This research uses descriptive laboratory research methods. The research began with the process of sample preparation for dried blood spot and venous blood, each using Whatman 903 paper and vacuum tubes containing EDTA, isolating genomic DNA using KIT *Zymo Research*, amplification of PMSA-2 genes with PCR, detection of PCR products through electrophoresis, measurement of DNA concentration and absorbance, and data analysis. The results of this study are expected to be a source of information about the advantages of two specimen storage methods for clinical blood samples, as well as providing a clear description of the quality of each specimen storage method based on the quality of its amplicon products. The results showed that a total of ten medical samples of dried blood spot and ten venous blood were isolated from the genomic DNA of ten and nine, respectively. PMSA-2 gene amplicons detected were seven in venous blood and six in dried blood spot. Venous blood specimens have sensitivity in detecting PMSA genes in samples with the highest value of 554 ng / μ L and purity of 2,007 (WB7), and concentration of 550.2 and highest purity of 2,076 (WB10). Venous blood storage techniques using categorized vacuum tubes are effective in the detection of PMSA-2 genes and have time efficiency in the process. From these results it was also concluded that the comparison analysis of amplicon products between venous blood specimens was better, more stable and efficient than dry blood spot specimens, thus recommending storage of venous blood specimens using vacuum tubes as the best storage method of blood sample specimens.

Key words: Venous blood, DNA purity, amplicon products, PMSA-2, dried blood spots.

PENDAHULUAN

Plasmodium Merozoite Surface Antigen-2 (PMSA-2) atau sering disebut MSP2 merupakan antigen yang dikembangkan sebagai komponen potensial untuk terapi malaria (Adda *et al.*, 2012). Studi yang dilakukan di Kenya menunjukkan

bahwa tingginya kadar antibodi alamiah terhadap PMSA-2 berkorelasi kuat dengan proteksi terhadap malaria klinis. Mayoritas masyarakat yang berdomisili di area dengan penyebaran *Plasmodium* tinggi mempunyai respon imunologis anti-PMSA-2 besar sebagai mekanisme respon pada paparan yang terulang (McCarthy *et al.*, 2011).

PMSA-2 sebagai sebuah gen potensial dapat diperoleh dari isolasi dan amplifikasi gen yang berasal dari beberapa sumber spesimen, yakni spot darah kering (DBS) atau darah vena (*whole blood*). Saat ini, materi biologis yang

* *Alamat korespondensi:*

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih. Jl. Kamp Wolker Kampus Baru, Uncen Waena, Jayapura, Papua.
E-mail: mawardiarsyam@gmail.com

dominan dianalisis adalah berupa darah, urin, plasma, serum dan saliva. Khusus untuk darah, dapat ditempuh dengan melalui vena (*Venipuncture*). Cara ini merupakan metode biosampling konvensional dan masih menjadi standar emas meski sering menimbulkan rasa sakit saat pengambilan darah (Evans *et al.*, 2015).

Sementara itu, teknik spot DBS memberikan penyederhanaan proses pengumpulan darah dan analisis dibandingkan metode vena. Metode sampel darah kering diperkirakan menjadi pengganti yang menjanjikan bahkan bisa melampaui metode bio-matriks (plasma/serum) untuk pengujian pemantauan terapi obat (Sharma *et al.*, 2014). Beberapa keuntungan penggunaan metode sampel darah kering antara lain; (1) mudah dan minimal invasif dalam mengumpulkan sampel, dapat dilakukan tanpa tenaga *phlebotomist* karena sampel dikumpulkan dari ujung jari atau tumit dengan invasif minimal menggunakan lancet steril (Wenkui *et al.*, 2015), (2) volume sampel yang digunakan sedikit, hal ini mudah diimplementasikan pada hewan kecil, anak-anak dan bayi (Wilhelm *et al.*, 2014), (3) analit lebih stabil dibandingkan penyimpanan pada freezer (Wilhelm *et al.*, 2014), (4) biaya yang lebih rendah dalam proses, karena sampel spot darah kering dapat disimpan yang pada suhu 4°C dan memerlukan *dry ice/ice box* (Deglon *et al.*, 2012), (5) memberikan keamanan, dalam keadaan kering senyawa patogen menjadi tidak aktif sehingga mengurangi risiko infeksi.

Metode spot darah kering dapat membantu aplikasi pada uji farmakokinetik dan toksikokinetik, monitoring penggunaan obat, skrining penyakit, tes penggunaan doping dan pengujian metabolisme. Namun demikian, untuk menguji spesimen spot darah kering dan spesimen vena (*whole blood*) harus melalui proses analisis molekular berupa isolasi DNA genom dan amplifikasi gen sehingga terverifikasi dengan baik. Keberhasilan amplifikasi gen melalui PCR dapat ditelusuri dengan melihat kualitas DNA genom yang digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk proses perbanyakan atau penggandaan DNA. Kualitas produk isolat DNA genom dan amplikon sangat ditentukan oleh kestabilan spesimen yang

digunakan. Penelitian ini ditujukan untuk menganalisis perbandingan kualitas produk amplikon terhadap gen PMSA-2 dari spesimen spot darah kering dan darah vena sekaligus menyeleksi metode penyimpanan spesimen sampel terbaik. Penelitian ini memberikan informasi tentang kelebihan dan kekurangan dua metode penyimpanan spesimen untuk sampel klinis darah, serta memberikan deskripsi mengenai kualitas dari masing-masing metode berdasarkan produk amplikonnya.

Berdasarkan kajian ini, maka untuk memperoleh gambaran yang jelas mengenai perbandingan kualitas produk amplikon PMSA-2 antara dua sumber spesimen berbeda, maka penelitian ini sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih Jayapura dan Laboratorium Mikrobiologi Balitbangkes Papua. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan Juni-Juli 2019.

Preparasi dan Skrining Sampel

Penelitian ini termasuk dalam penelitian deskriptif laboratoris.

Spot Darah Kering/ Dried Blood Spot (DBS)

Pemakaian kertas spot darah kering

Kertas filter yang digunakan adalah jenis Whatman 903 berdasarkan rekomendasi dari *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). Sampel spot darah kering diambil dari sampel lanjutan rangkaian penelitian yang pernah dilakukan di Papua, yakni manusia sampel darah yang diambil dari jari tangan dengan cara menggunakan lancet steril. Kertas filter tidak ditumpuk atau dicegah agar bagian bercak tidak tersentuh permukaannya saat pengeringan, dihindarkan dari interaksi langsung seperti paparan matahari, terkena debu, atau pengotor yang berpotensi mengurangi

kualitas. Kertas whatman dikeringkan untuk menjaga kestabilan analit, agar pH, suhu dan kelembaban tetap terjaga pada kondisi yang baik (Liu *et al.*, 2011).

Penyimpanan dan pengiriman

Penyimpanan dan pengiriman dilakukan pada suhu 4 °C. Proses *storage* dalam waktu yang lama disimpan pada suhu 4 °C, namun dalam perjalanan dan preparasi proses isolasi dapat diletakkan pada suhu ruang, selama 3 hingga 4 hari. Proses penyimpanan dan pengiriman diupayakan berada pada suhu yang konstan. Kelembaban kertas spot darah kering dijaga agar tidak mempengaruhi stabilitas analit dan mencegah peluang pertumbuhan bakteri. Untuk memberikan perlindungan ekstra, kertas whatman dikemas dalam tas plastik bersegel (Rizwana *et al.*, 2013).

Ekstraksi dan Isolasi DNA

Kertas whatman yang telah kering dibuat lingkaran dengan diameter tertentu pada bagian bercaknya dengan memotong kertas yang dapat dilakukan secara manual, semi-otomatis, dan otomatis (Oliveira *et al.*, 2014). Diameter darah pada kertas ditentukan jumlah volume darah sampel yang diberikan (Spooner, 2013). Sekitar 7-10 µL setiap sampel darah menghasilkan spot darah berdiameter 1 cm. Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan sebuah KIT ekstraksi. Ekstraksi analit tersebut sudah sesuai dengan pelarut yang terdapat dalam KIT. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir terjadinya kotor atau kontaminasi dari dalam sel (Chambers *et al.*, 2013). Ekstraksi dengan spot darah kering pada dasarnya dilakukan dengan ekstraksi cair-cair atau pun ekstraksi fase padat (Edward *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2014).

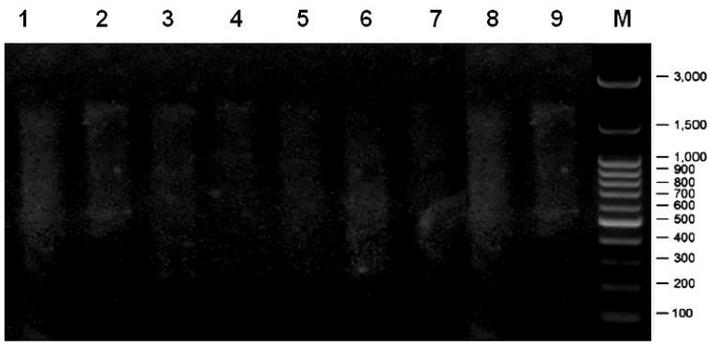
Sampel Darah Vena (Whole Blood)

Total 10 sampel klinis diisolasi DNA genomnya menggunakan protokol dari perusahaan Zymo Research dengan produk *Quick-DNA™ Universal Kit*. Sebanyak 500 µl *buffer* GMO1 dan 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) ditambahkan pada sampel darah 200 µl, kemudian divorteks

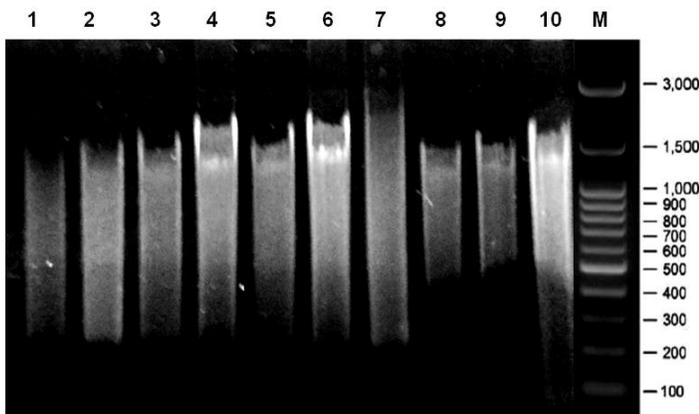
selama 1 menit. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 56 °C selama 1 jam dan dikocok setiap 15 menit sekali. Selanjutnya, 200 µl Buffer GMO2 ditambahkan pada campuran dan divorteks selama 1 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruang (15-25 °C) selama 10 menit. Campuran disentrifugasi pada 13.800g selama 5 menit, supernatan dipindahkan pada tabung baru. Sebanyak 0,7 volume isopropanol 80% ditambahkan pada supernatan lalu dihomogenkan dengan cara divorteks (contohnya ditambahkan 350 µl isopropanol 80% pada 500 µl supernatan), disentrifugasi pada kecepatan 13.800g selama 3 menit dan supernatan dibuang. Pelet disimpan untuk digunakan selanjutnya. Sebanyak 700 µl alkohol 70 % ditambahkan pada pelet, dihomogenisasi dengan vorteks selama 5 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 13.800g, supernatan dibuang kemudian ditambahkan kembali 700 µl alkohol 70 %, divorteks dan disentrifugasi dengan cara yang sama. Penutup tabung dibuka dan diinkubasi pada suhu ruang (15-25 °C) selama 10 menit. Selanjutnya, 20-50 µl *buffer* TE ditambahkan pada pelet dan dihomogenisasi dengan vorteks selama 1 menit. Hasil isolasi DNA dikonfirmasi dengan elektroforesis *gel agarose* 1 %, pada tegangan 70 volt selama 35 menit.

Amplifikasi gen PMSA-2 dengan PCR

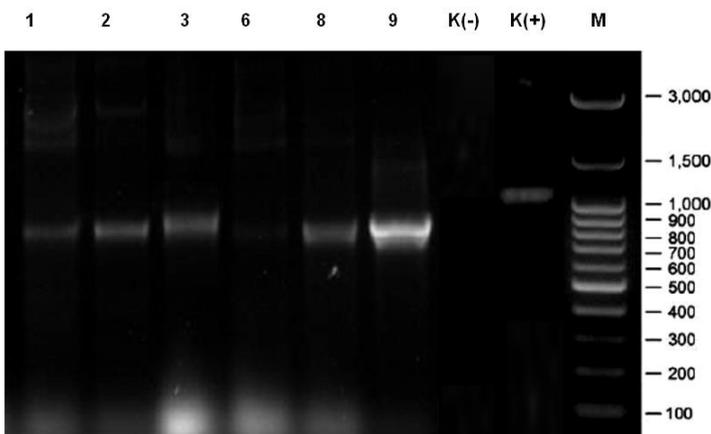
Gen PMSA-2 diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan DNA genomik sebagai cetakan. Kontrol negatif tanpa DNA disertakan untuk memastikan reagen reagen PCR yang digunakan bebas kontaminasi. Total volume *master mix* 90 µL yang dibagi ke dalam lima tabung PCR dengan masing-masing tabung berisi 18 µL kemudian setiap tabung ditambahkan DNA cetakan sebanyak 2 µL lalu dicampur hingga menyatu dengan baik. Primer yang digunakan adalah MSP2 (Primer forward: 5'GAA GTT AAT TAA AAC ATT GTC3', dan Primer Reverse: 3'GAG GGA TGT TGC TGC TCC ACA G5. Amplifikasi gen PMSA-2 dikonfirmasi dengan elektroforesis *gel agarose* 1 %, pada tegangan 70 volt selama 35 menit.



Gambar 1. Elektroferogram DNA Genom dari spesimen DBS. Ket.: 1- = Sampel Spot darah kering/ DBS, M = Marker DNA Ladder 100 bp.



Gambar 2. Elektroferogram isolasi DNA genom dari spesimen *whole blood*. Ket.: 1-10 = Sampel darah vena, M= Marker DNA Ladder 100 bp.



Gambar 3. Hasil Amplifikasi gen PMSA-2 spesimen DBS. Ket.: 1,2,3,6,8,9 = gen PMSA-2 sampel DBS1, DBS2, DBS3, DBS6, DBS8, dan DBS9 K(-) = Kontrol negatif, K(+)= Kontrol positif, M= Marker 100 bp.

Pengukuran Konsentrasi DNA

Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Sementara itu parameter yang dijadikan tolak ukur adalah kualitas dan kuantitas DNA genom dan produk PCR (amplikon), kemudahan dalam mengerjakan sampel, serta efisiensi waktunya.

Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji deskriptif kualitatif. Hasil elektroforesis dihubungkan dengan jenis spesimennya. Parameter yang diamati adalah efisiensi waktu pengerjaan, kemudahan, kualitas dan kuantitas produk amplikon.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA Genomik

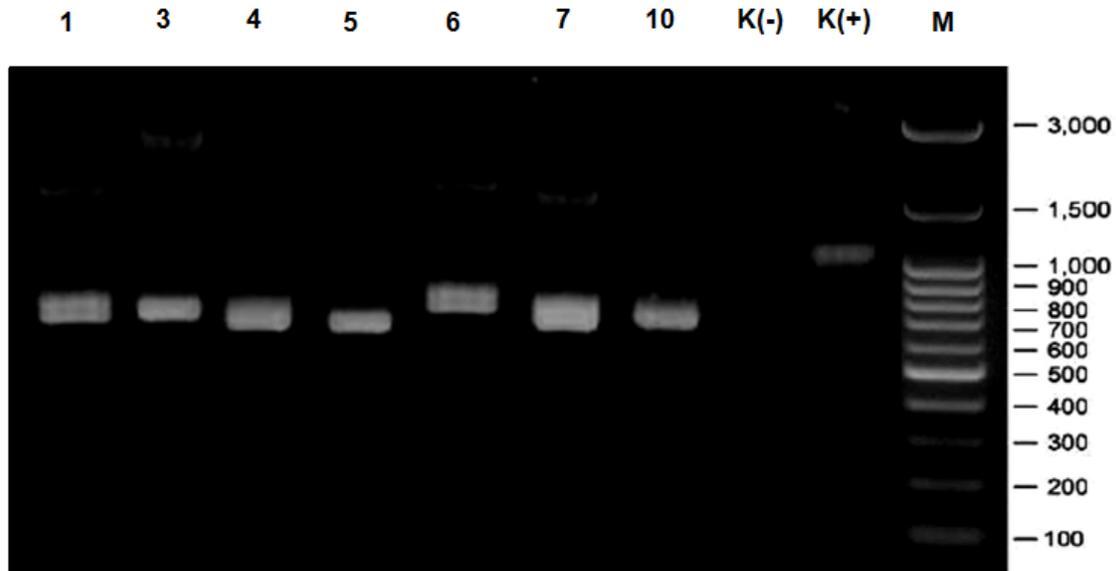
Hasil isolasi DNA genomik dengan menggunakan sampel DBS menghasilkan DNA genom yang relatif sedikit, menghasilkan DNA genom dengan jumlah yang tidak terlalu tebal. Elektroferogram DNA genomik sampel klinis dari DBS menunjukkan hasil profil pita yang terlihat agak samar dan tipis. Hal tersebut disebabkan karena *Proteinase-K* dan proses *mixing* sehingga DNA genomik yang diperoleh tidak begitu banyak.

Berdasarkan gambar 1, sampel spot darah kering (DBS) memperlihatkan bahwa pita DNA genom yang terbentuk menunjukkan bahwa pola pita tersebut mempunyai *smear*, dari sepuluh spesimen DBS hanya berhasil diisolasi sebanyak sembilan. Kenampakan yang terlihat pada seluruh spesimen DBS pita DNA genom yang dihasilkan tampak seragam, kualitasnya tidak terlalu terang bahkan nyaris tidak terlihat. Kualitas DNA genom dapat dikategorikan baik apabila fragmen DNA tersebut ditunjukkan dengan pita DNA genom yang jelas dan terang. Dalam proses isolasi DNA genomik ini, protokol isolasinya menggunakan KIT *Zymo Research*. Terdapat beberapa larutan buffer yang berperan penting untuk proses destruksi dinding sel. Pada saat yang sama kandungan di dalam buffer

mampu memberi konsistensi DNA dalam rangkaian isolasi, purifikasi, hingga tahap *storage* yang mampu memberi kestabilan DNA. Dari keseluruhan sampel yang tersedia, tidak semua sampel dapat terisolasi DNA genomnya disebabkan oleh rentang waktu optimasi KIT dalam proses isolasi DNA genom (Mawardi &

Ramandey, 2017).

Proses isolasi DNA genomik dari spesimen darah vena memperlihatkan hasil yang berbeda dari spesimen DBS (Gambar 2). Gambar 2 memperlihatkan hasil isolasi DNA genom dari sampel darah vena menghasilkan DNA genom yang tebal dan terlihat jelas. Seperti halnya pada



Gambar 4. Hasil Amplifikasi gen PMSA-2 spesimen *whole blood*. Ket.: 1,3,4,5,6,7,10 = gen PMSA-2 sampel DBS1, DBS3, DBS4, DBS5, DBS6, DBS7, dan DBS10, K(-) = Kontrol negatif, K(+) = Kontrol positif, M= Marker Ladder 100 bp.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian amplicon gen PMSA-2.

Sampel / spesimen		Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (A260/ A280)
Spot Darah Kering/ <i>Dried Blood Spot</i> (DBS)	DBS 1	309,8	1,894
	DBS2	260	1,074
	DBS3	303	1,642
	DBS6	243	1,467
	DBS8	335	1,952
	DBS9	406	1,858
Darah vena/ <i>Whole Blood</i> (WB)	WB1	375	1,978
	WB3	538	2,002
	WB4	522,5	2,000
	WB5	403	1,996
	WB6	350,6	1,964
	WB7	554	2,007
	WB10	550,2	2,076

spesimen spot darah kering, proses isolasi pada sampel darah vena juga menggunakan Kit *Zymo research*. Pada proses pengerjaannya ada penambahan larutan buffer yang mengandung agen pengelat dan larutan Proteinase-K. Larutan EDTA berperan meng-inaktivasi enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi, EDTA dapat menginaktivasi atau merusak enzim tersebut dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase (Corkill & Rapley, 2008). Larutan Proteinase-K secara enzimatik berperan dalam memecah eritrosit pada daerah membran sel (Khosravinia *et al.*, 2007), selain itu mampu merombak struktur protein dan ikatan polipeptida dalam komponen sel (Sambrook *et al.*, 1989). Data dua hasil elektroforesis DNA genom secara keseluruhan menunjukkan beberapa hasil berbeda, ada yang menghasilkan pita DNA yang terang, ada juga yang agak tipis, serta *smear* yang terlihat tebal, terkhusus untuk spesimen darah vena memperoleh pita yang jelas dan terang. Terjadinya pita yang tipis dapat disebabkan karena pada saat rangkaian perlakuan isolasi DNA, pelet dicuci dengan larutan KIT yang mengandung etanol absolut, pelet terlepas saat pembuangan etanol absolut sehingga pelet pun ikut terbuang (Mawardi & Simonapendi, 2016). Sementara itu *smear* bisa terjadi karena masih terdapatnya kontaminan seperti protein, DNA yang terdegradasi, atau pengotor lainnya yang terbawa sisa larutan pada proses isolasi (Mulyani *et al.*, 2011). Kualitas pita DNA yang jelas dan terang menjadi indikasi awal bahwa spesimen darah vena layak untuk dijadikan sebagai pilihan untuk sumber analisis molekular, namun tentunya harus ditinjau pula ketepatan dalam mengikuti prosedur isolasi dalam kit yang dipakai, tidak

adanya kekeliruan, kontaminasi, serta komponen reagen yang masih dalam kondisi baik.

Hasil Amplifikasi gen PMSA-2

Isolat DNA genom selanjutnya dilakukan proses amplifikasi dengan menerapkan prinsip PCR. Gen PMSA-2 yang sudah diamplifikasi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Total 9 dan 10 isolat DNA genomik yang diperoleh dari masing-masing spesimen, perbedaan hasil antara kedua spesimen tidak hanya terlihat dari kualitas pita DNA yang terbentuk, tetapi juga dalam hal amplifikasi gen-nya. Pada masing-masing spesimen spot darah kering dan darah vena, ada beberapa DNA genomik yang proses PCR nya tidak mampu mengamplifikasi daerah spesifik yang diinginkan dan tidak terdeteksi gen PMSA-2. Pada gambar 3 dan 4, DNA genomik spot darah kering yang terdeteksi gen PMSA-2 hanya 6 sampel (DBS1, DBS2, DBS3, DBS6, DBS8, dan DBS9), sementara DNA genomik darah vena terdeteksi 7 sampel (DBS1, DBS3, DBS4, DBS5, DBS6, DBS7, dan DBS10). Hal tersebut bisa saja terjadi karena DNA genomik adalah akumulasi dari seluruh DNA yang terdapat dalam darah, baik dari DNA parasit maupun DNA pasien. Sehingga pita itulah yang menunjukkan indikasi keberadaan gen spesifik dalam genom tersebut.

Berdasarkan gambar 4, terlihat bahwa terdapat tujuh spesimen *whole blood* menunjukkan hasil positif (+) gen PMSA-2. Ketujuh sampel positif terdeteksi gen PMSA-2 adalah sampel kode 1,3,4,5,6,7,10 (DBS1, DBS3, DBS4, DBS5, DBS6, DBS7 dan DBS10) yang dibuktikan dengan keberadaan fragmen *band* DNA. Sementara sampel yang lain yaitu kode 2,8, dan 9 (DBS2, DBS8 dan DBS9) tidak menghasilkan pita DNA. Profil pita fragmen

Tabel 4. Indikator efektifitas dan kestabilan amplikon PMSA-2 dari dua spesimen.

Spesimen/Sampel	Perbandingan amplikon PMSA-2			
	Amplifikasi	Nilai Absorbansi/ Kemurnian	Nilai Konsentrasi Amplikon	Efisiensi Waktu
Spot darah kering (DBS)	√	√	√	√
Darah vena (<i>whole Blood</i>)	√√	√√	√√	√

Ket.: √ : Baik; √√ : Sangat baik

yang berada pada posisi yang sama dengan *ladder* (marker) menjadi indikasi kuat terdeteksinya gen PMSA-2 baik pada sampel spot darah kering maupun darah vena.

Uji kualitatif elektroforesis agarose (horizontal) menggunakan metode standar yakni dengan migrasi DNA melalui elektroforesis gel agarosa. Proses elektroforesis berlangsung dengan baik, hal ini tidak terlepas dari beberapa faktor dalam prosesnya didukung oleh ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik, serta suhu. Berdasarkan elektroferogram, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fragmen DNA terpisah dalam gel, keberadaan EtBr sebagai pewarna akan terikat di antara untai ganda DNA. Pita DNA dalam agarosa akan berpendar karena EtBr mengandung zat fluoresen. Ikatan DNA-EtBr akan terekspos pada sinar UV pada panjang gelombang λ 300 nm. Hasil uji kualitatif memperlihatkan bahwa profil pitanya terlihat terang, tebal, dan sedikit *smear*.

Gen PMSA-2 selanjutnya diuji secara kuantitatif. Uji kuantitatif gen PMSA-2 hasil amplifikasi berbasis PCR diukur dengan menggunakan alat *Multiskan GO Microplate Spectrophotometer from Thermo Scientific* yang dikombinasikan dengan *Invitrogen TM QubitTM 3.0 Quantitation*, keduanya merupakan alat yang prinsip kerjanya menyerupai spektrofotometer UV-Vis yang mempunyai teknologi nanodrop, DNA murni atau hasil amplifikasi dapat menyerap cahaya ultraviolet karena adanya basa nitrogen purin dan pirimidin. Pita ganda DNA secara maksimal menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein, fenol dan pengotor lainnya akan menyerap cahaya secara maksimal pada gelombang 280 nm, sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$).

Jika dibandingkan, nilai konsentrasi DNA yang diperoleh pada spesimen darah vena/ *whole blood* mempunyai nilai konsentrasi yang tinggi dibanding dengan spesimen spot darah kering. Pada spesimen spot darah kering nilai konsentrasi tertinggi adalah pada spesimen 9 (DBS9) dengan

konsentrasi 406 ng/ μL dan kemurnian 1,858. Sementara itu, untuk spesimen darah vena, nilai konsentrasi tertinggi adalah pada spesimen 7 (WB7) dengan konsentrasi 554 ng/ μL , sedangkan kemurniannya mencapai 2,007.

Berdasarkan Tabel 1, nilai konsentrasi tinggi tidak selalu berbanding lurus dengan tingginya nilai kemurniaan. Secara teoritis panjang gelombang A260 adalah panjang gelombang maksimal yang diserap oleh DNA, sementara panjang gelombang A280 adalah panjang gelombang yang diserap oleh komponen selain DNA, bisa berupa pengotor atau kontaminan, termasuk karbohidrat, protein, RNA, hingga inhibitor. Sehingga ini kombinasi A260 dan A280 inilah yang berperan dalam menentukan nilai kemurnian. Dengan demikian, meskipun konsentrasi DNA tinggi, tapi kemungkinan besar pada saat yang sama juga mengandung kontaminan yang tinggi ataupun sebaliknya. Tabel 1 tersebut terlihat bahwa nilai konsentrasi spesimen spot darah kering DBS8 yakni 335 ng/ μL dengan nilai kemurnian 1,952. Bila dihubungkan dengan elektroforesis hasil PCR gen PMSA-2 dari spesimen spot darah kering, terlihat bahwa fragmen pita hasil PCR spesimen 8 (DBS8) tampak terang tetapi terdapat *smear* di daerah bagian bawah pita DNA. Hal tersebut mengindikasikan terdapatnya kandungan pengotor dan adanya kontaminasi. Sehingga bila dibandingkan antara DBS 8 dan DBS 9, tentu kita lebih memilih DBS 8, karena kemurniannya lebih tinggi. Prinsip yang sama juga terjadi pada spesimen darah vena antara WB 7 dan WB 10. Spesimen kode WB7 memiliki nilai konsentrasi 554 ng/ μL dengan kemurnian 2,007. Spesimen kode WB10 mempunyai nilai konsentrasi 550,2 ng/ μL dan kemurnian 2,076. Berdasarkan kualitasnya, spesimen yang terbaik untuk dipilih adalah spesimen WB10. Secara keseluruhan jika dibandingkan antara spesimen darah kering dan darah vena dengan indikator kuantitatif nilai konsentrasi dan nilai kemurnian. Maka hasil yang diperoleh dari sampel darah vena lebih direkomendasikan untuk analisis molekular lebih lanjut.

Lama durasi waktu yang dipakai dalam proses pengerjaan spesimen sejak tahapan awal tentu menjadi hal yang juga sangat penting sehingga dapat dideteksi efektivitas dari suatu metode penyimpanan spesimen darah. Menjadi sesuatu yang vital untuk mengkalkulasinya selama proses isolasi DNA genomik, berapa lama waktu yang dibutuhkan. Isolasi DNA genomik dari dua sumber spesimen yaitu spot darah kering dan darah vena keduanya menggunakan kit isolasi, sehingga protokol yang dipakai sama dan durasi waktu yang terpakai saat pengerjaan ditentukan oleh seberapa praktis dan mudahnya penggunaan darah dari masing-masing sumber spesimen untuk diisolasi DNA genomiknya. Didapatkan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk proses awal pada spesimen spot darah kering lebih lama dari spesimen darah vena, karena spot darah kering pada kertas *whatman* harus dilarutkan terlebih dahulu sebelum melangkah pada awal protokol kit isolasi. Untuk penambahan larutan kimia yang digunakan selama proses isolasi, perlakuan inkubasi dan sentrifugasi durasi waktunya adalah sama. Secara umum bila merujuk pada protokol isolasi DNA genomik dengan kit *zymo research*, proses isolasinya secara keseluruhan membutuhkan waktu sekitar 25 menit. Terkhusus untuk spesimen spot darah kering ada tambahan waktu 5-10 menit untuk melarutkan spot darah pada kertas. Pada indikator efisiensi waktu dalam tahapan isolasi DNA, jelas bahwa spesimen darah vena menggunakan waktu yang lebih singkat daripada spot darah kering. Untuk proses PCR hingga visualisasi, serta pengukuran konsentrasi dan absorbansi, kedua spesimen menggunakan protokol yang sama sehingga durasi waktu yang digunakan adalah sama. Hal yang membedakan adalah nilai hasil pengukurannya dan kenampakan fragmen pola pitanya.

Berdasarkan beberapa indikator pencapaian yang diperoleh dalam penelitian ini, didapatkan beberapa perbandingan efektivitas dan kualitas kestabilan amplikon hasil PCR, yakni kualitas amplifikasi melalui visualiasi DNA, nilai absorbansi/ kemurnian DNA, Nilai konsentrasi, dan efisiensi waktu dalam pengerjaan.

Merujuk pada tabel 2 yang dikompilasi dengan tabel 1, berdasarkan dua spesimen, perolehan konsentrasi amplikon yang paling tinggi didapatkan dari spesimen darah vena yakni mencapai 554 ng/ μ L. Kemudian spot darah kering yang mempunyai konsentrasi 406 ng/ μ L. Perolehan nilai kemurnian produk amplikon dari setiap spesimen darah menunjukkan hasil yang baik, berada pada rentang nilai 1,074 hingga 2,076 (Tabel 1). Tabel 2 memberikan informasi bahwa spesimen yang mempunyai efisiensi durasi waktu dan proses pengerjaan yang singkat adalah metode spesimen darah vena yang penyimpanannya dalam tabung vakum, proses isolasi DNA genomik hanya sekitar \pm 25 menit, sementara spot darah kering sekitar \pm 35 menit. Produk amplikonnya spot darah kering pun menunjukkan adanya gen PMSA-2 yang lebih banyak. Dari segi efisiensi waktu dan teknik pengerjaannya, menghabiskan durasi waktu sekitar 2 jam yang cukup menguras waktu. Namun demikian, walaupun waktu pengerjaan yang terkategori lama tapi hal ini tidak akan menjadi sebuah masalah serius, selama mampu mendeteksi gen PMSA-2, indikator efisiensi, dan kestabilan produk amplifikasi terpenuhi dengan baik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa spesimen darah vena (*whole blood*) memiliki sensitifitas dalam mendeteksi gen PMSA pada sampel dengan capaian nilai konsentrasi yaitu 554 ng/ μ L dan kemurnian 2,007 (sampel WB7), serta konsentrasi 550,2 dan kemurnian 2,076 (sampel WB10). Teknik penyimpanan dengan darah vena menggunakan tabung vakum termasuk efektif dalam deteksi gen PMSA-2 serta memiliki efisiensi waktu dalam proses pengerjaan. Produk amplikon spesimen darah vena hasilnya lebih baik, stabil dan efisien daripada spesimen spot darah kering, sehingga direkomendasikan spesimen darah vena yang menggunakan tabung vakum sebagai metode penyimpanan terbaik dari spesimen sampel darah.

DAFTAR PUSTAKA

- Adda, C.G., C.A. MacRaild, L. Reiling, K. Wycherley, M.J. Boyle, and V. Kienzle. 2012. Antigenic characterization of an intrinsically unstructured protein, *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2. *Infection and Immunity*. 80(12): 4177-4185.
- Chambers A.G., J.P. Andrew, Y. Juncong, G.C. Alexander, and H.B. Christoph. 2013. Multiplexed quantitation of endogenous proteins in dried blood spots by multiple reaction monitoring - mass spectrometry. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 12(3):781-791.
- Corkill, G., and R. Rapley. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic tools and techniques. in: molecular biomethods handbook second edition. ed: walker*. Humana Press. USA.
- Deglon J., T. Aurelien, M. Patrice, and S. Christian. 2012. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 402:2485-2498.
- Edwards R.L., J.C. Andrew, B. Mark, G. Paul, B. Josephine, and J.C. Helen. 2011. Hemoglobin variant analysis via direct surface sampling of dried blood spots coupled with high - resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83:2265-2270.
- Evans C., A. Mark, B. Peter, Jeffrey, A.J. Christopher, L. Wenkui, L. Steve, M. Luca, O. Timothy, T. Philip, W. Xiaomin, W. Enaksha, W. John, W. Eric, and Z. Patricia. 2015. Implementing dried blood spot sampling for clinical pharmacokinetic determinations: considerations from the iq consortium microsampling working group. *The AAPS Journal*. 17(2): 292-300.
- Food and Drug Administration. 2001. *Guidance for industry bioanalytical method validation*. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. USA.
- Khosravinia, H., H.N. Murthy, D.T. Parasad, and N. Pirany. 2007. Optimizing factors influencing dna extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of 481-486. Biotechnology*. 6(4):481-486
- Liu, G., Q.C. Ji, M. Jemal, A.A. Tymiak, and M.E. Arnold. 2011. Approach to evaluating dried blood spot sample stability during drying process and discovery of a treated card to maintain analyte stability by rapid on-card pH modification. *Anal. Chem.* 83: 9033.
- Mawardi, A., dan M.L. Simonapendi. 2016. Uji efektivitas metode isolasi DNA genom kopi arabika (*Coffea arabica* L.) asal kabupaten Jayawijaya. *Jurnal Biologi Papua*. 8(1): 7-12.
- Mawardi, A., dan E.R.P.F. Ramandey. 2017. Ligasi dan transformasi gen MSP1 *Plasmodium falciparum* penyebab malaria di Jayapura. *Majalah Kedokteran Bandung*. 49(4):213-223.
- McCarthy, J.S., J. Marjason, S. Elliott, P. Fahey, G. Bang, and E. Malkin. 2011. A Phase 1 trial of mSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoform of MSP2 formulated with montanide® ISA 720. *PLoS One*. 6(9): 1-13.
- Mulyani, Y., A. Purwanto., I. Nurruhwati. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi dna untuk deteksi dini Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*. 2(1):1-16.
- Oliveira, R.V., H. Jack, and W. Enaksha. 2014. Fully-automated approach for online dried blood spot extraction and bioanalysis by two dimensional-liquid chromatography coupled with high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 86:1246-1253.
- Rizwana, Q., J. Raka, and A. Atul. 2013. The use of dried blood spot samples in screening drugs of abuse. *Pharmacology & Pharmacy*. 4:152-159.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sharma, A., J. Swati, S. Mahendra, and L. Jawahar. 2014. Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Test. Analysis*. DOI 10.1002/dta.1646.
- Soto, M., P. Roger, A. Valerie, Mylowagner, P. Ronya, P. Manuel, M. James, A.J. Christopher, L.S. Kevin, and W.R. Marc. 2014. Evaluation of matrix microsampling methods for therapeutic drug candidate quantification in discovery-stage rodent pharmacokinetic studies. *Bioanalysis*. 6(16):2135-2146.
- Spooner, N. 2013. A dried blood spot update: still an important bioanalytical technique. *Bioanalysis*. 5(8):879-883.
- Wenkui, L., D. John, M. Paul, F. Jimmy, and L.S.T. Francis. 2015. LC-MS/MS bioanalysis of loratadine (Claritin) in dried blood spot (DBS) samples collected by subjects in a clinical research study. *Journal of Chromatography B*. 983: 117-124.
- Wilhelm, A.J., C.G. Jeroen, D. Burger, and L.S. Eleonora. 2014. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions. *Clin. Pharmacokine.* 53:961-973.