

OPTIMASI EKSTRAKSI RNA (*Ribo Nucleic Acid*) DARI VIRUS AI MENGGUNAKAN METODE PRE EKSTRAKSI

YUNI YUPIANA, EMILIA, YATI SURYATI, DODO HERMAWAN.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan Gunungsindur, Bogor 16340

ABSTRAK

Untuk mendapatkan metode ekstraksi yang optimal, 3 metode pre ekstraksi yaitu metode pre ekstraksi Trizol, DMSO dan sentrifugasi telah dibandingkan. Pada penelitian ini digunakan 5 sampel yang terdiri dari virus H5N1, virus H5N2, vaksin H5N1, vaksin H5N2 dan air destilasi (DW) sebagai *control negative*. Semua sampel kemudian diekstraksi dengan menggunakan metoda ekstraksi spin kolom. Hasil yang diperoleh menunjukkan produk yang hampir sama. Namun dengan menggunakan metoda DMSO dan sentrifugasi, negatif kontrol masih menunjukkan *band* halus pada agar elektroforesis yang kemungkinan merupakan kontaminan selama proses pre ekstraksi. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan metoda pre ekstraksi Trizol, ekstraksi menjadi lebih optimal.

Kata kunci: Pre ekstraksi, PCR, Vaksin, AI

ABSTRACT

To obtain optimize extraction method, 3 kinds of pre extraction methods namely Trizol, DMSO and Centrifugation method have been compared. In this study was used 5 samples consisted of H5N1 virus, H5N2 virus, H5N1 vaccine, H5N2 vaccine and DW (distilled water) as control negative. All of the samples were extracted using 3 kinds of pre extraction methods, then extracted using the same method which was spin column method. The result showed that all of the pre extraction methods yielded almost the same result. However negative control using DMSO and Centrifugation methods, showed light band on electrophoresis agar gel that was believed as contaminant during pre extraction. From this result can conclude that using Trizol pre extraction method, the extraction is more promising.

Keywords: Pre extraction, PCR, Vaccine, AI.

PENDAHULUAN

RNA dari virus AI dapat diekstraksi dari beberapa sumber yang berbeda baik secara *in vitro* maupun *in vivo* meskipun beberapa sumber seperti supernatant sel atau cairan alantois lebih mudah untuk isolasi karena secara umum mengandung jumlah virus yang tinggi (6). Sementara bahan lain seperti vaksin AI yang mengandung oil adjuvant memiliki kesulitan yang lebih tinggi karena adanya *oil adjuvant* kemungkinan menghalangi ekstraksi RNA virus dari vaksin. Sehingga dibutuhkan ekstraksi dan purifikasi RNA secara efisien untuk mendapatkan jumlah RNA yang lebih optimal (5).

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMOSH) sebagai instansi yang memiliki tanggung jawab untuk menjamin obat hewan yang beredar di Indonesia berkomitmen untuk memberi pelayanan yang terbaik dengan mengembangkan metoda uji yang lebih akurat dan efisien. Dalam pengujian vaksin AI, BBPMOSH melakukan pengujian identitas dengan metode PCR baik konvensional maupun *real time* PCR yang bertujuan mengkonfirmasi sub tipe virus AI yang terkandung dalam vaksin AI tersebut.

Semua vaksin AI di Indonesia tersedia dalam bentuk inaktif dalam *oil adjuvant* yang mengakibatkan sulitnya proses isolasi RNA virus dari vaksin ini dibanding dengan bahan yang lain seperti cairan alantois. Sehingga untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal, perlu dilakukan pengembangan metoda ekstraksi (4) maupun pre ekstraksi.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan hasil ekstraksi/isolasi RNA virus dalam vaksin yang lebih optimal dengan membandingkan beberapa metoda pre ekstraksi.

MATERI DAN METODE

Materi

Dalam penelitian ini digunakan 5 sampel yaitu virus H5N1, virus H5N2, vaksin H5N1, vaksin H5N2 dan DW sebagai kontrol negatif untuk setiap metoda pre ekstraksi.

Metode

Metode pre ekstraksi yang digunakan terdiri dari 3 metoda pre ekstraksi. Sedangkan metoda ekstraksi dilakukan dengan metoda spin kolom.

Metode Pre ekstraksi

Metode Pre ekstraksi dengan Trizol

Metode pre ekstraksi ini dilakukan berdasarkan metoda yang dikembangkan oleh Erica Spackman, Ph.D., Southeast Poultry Research Lab U.S. Dept. of Agriculture, Agriculture Research Service 934 College Station Rd., Athens, GA 30605

Vaksin divorteks pada kecepatan medium (posisi 5) selama 30 menit. Kemudian dimasukkan 100 µl vaksin ke dalam tabung ukuran 1.5 ml dan ditambahkan dengan 150 µl *nuclease free water*, kemudian dikocok. Setelah itu ditambahkan 750 µl Trizol LS dan divorteks selama 5 detik dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 menit. Kemudian ditambahkan 200 µl chloroform dan diinkubasi lagi pada suhu kamar selama 7 menit dan disentrifugasi selama 15 menit pada 14,000 Xg. Setelah itu diperoleh tiga lapisan, dua lapisan teratas mengandung RNA virus. Kemudian RNA dilarutkan dengan 100 µl *nuclease free water*.

Metode Pre ekstraksi dengan DMSO

Metode pre ekstraksi ini dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan oleh DR.Gerard D.Wellenberg GD.Deventer The Netherlands.

Vaksin divorteks pada kecepatan medium (posisi 5) selama 30 menit. Kemudian diambil 3 ml vaksin dan dicampur dengan 1 ml DMSO 5% lalu divorteks selama 3 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm dan diambil sedimennya.

Metode Pre ekstraksi Sentrifugasi

Vaksin dikocok dengan menggunakan *orbital shaker* pada kecepatan medium selama 30 menit. Kemudian diambil 3 ml vaksin dan dilakukan sentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm lalu diambil endapannya.

Kemudian semua hasil pre ekstraksi di ekstraksi dengan menggunakan metoda spin kolom, diamplifikasi dan dideteksi pada gel agar dengan metoda yang sama.

Metode Ekstraksi dengan Spin Kolom

Pipet 560 µl Buffer AVL yang mengandung *carrier* RNA lalu ditambahkan dengan 140 µl isolat virus kemudian divorteks selama 15 s. Setelah itu diinkubasi pada RT selama 10 menit. Disentrifugasi singkat untuk menghilangkan tetesan air pada tutup. Kemudian dilakukan penambahan 560 µl ethanol (96-100%) ke dalam sampel kemudian di vorteks selama 15 s. Lalu dimasukkan 630 µl larutan tersebut ke dalam *QIAamp Mini spin column* (in a 2 ml collection tube) tanpa membasahi rim. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp spin column* ke dalam 2 ml *collection tube* yang baru dan buang filtrate. Ulangi langkah ini sekali lagi lalu tambahkan 500 µl Buffer AW1. Kemudian lakukan sentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp Mini spin column* pada 2 ml *collection tube* yang baru dan buang filtrate. Secara hati-hati *QIAamp Mini spin column* dibuka dan ditambahkan 500 l Buffer Aw2. Kemudian lakukan sentrifugasi pada kecepatan tinggi yaitu 20.000 x g; 14.000 rpm selam 3 min. Kemudian diulangi langkah ini. Kemudian ditambahkan 60 µl of Buffer AVE diinkubasi pada RT 1 min dan disentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama 1 min. Selanjutnya RNA diubah menjadi DNA dan dideteksi dengan gel agar elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel. Hasil pengujian dengan PCR menggunakan tiga metoda pre ekstraksi

No.	Pre ekstraksi	SAMPEL	HASIL
1	Metoda 1	Negatif kontrol (<i>RNAse Freewater</i>)	(-)
2	Metoda 1	Positif Kontrol (Virus H5N1)	(+)
3	Metoda 1	Positif Kontrol (Virus H5N2)	(+)

4	Metoda 1	Vaksin H5N1	(+)
5	Metoda 1	Vaksin H5N2	(+)
6	Metoda 2	Negatif kontrol (<i>RNAse Freewater</i>)	(-/+)
7	Metoda 2	Positif Kontrol (Virus H5N1)	(+)
8	Metoda 2	Positif Kontrol (Virus H5N2)	(+)
9	Metoda 2	Vaksin H5N1	(+)
10	Metoda 2	Vaksin H5N2	(+)
11	Metoda 3	Negatif kontrol (<i>RNAse Freewater</i>)	(-/+)
12	Metoda 3	Positif Kontrol (Virus H5N1)	(+)
13	Metoda 3	Positif Kontrol (Virus H5N2)	(+)
14	Metoda 3	Vaksin H5N1	(+)
15	Metoda 3	Vaksin H5N2	(+)

Keterangan:

Metoda 1 : Metoda Pre ekstraksi dengan Trizol

Metoda 2 : Metoda Pre ekstraksi dengan DMSO

Metoda 3 : Metoda Pre ekstraksi dengan Sentrifugasi

Trizol atau *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform* bekerja dengan cara menjaga integritas RNA namun memiliki aktivitas melepaskan ikatan sel dan komponen-komponennya sehingga kemungkinan dapat mengurangi ikatan *oil adjuvant* pada vaksin (2). Sementara DMSO memiliki kemampuan untuk melarutkan banyak zat/komponen sehingga kemungkinan dapat melarutkan *oil adjuvant* tanpa merusak RNA virus yang terkandung dalam vaksin. Sedangkan metoda sentrifugasi kurang optimal karena hanya berfungsi memisahkan fase minyak dan air.

Pada tabel ditunjukkan bahwa dengan menggunakan ketiga metoda pre ekstraksi diperoleh hasil yang hampir sama yaitu kedua kontrol positif terkonfirmasi positif H5, kedua vaksin AI juga positif terhadap H5. Namun terdapat sedikit perbedaan pada kontrol negatif bila pre ekstraksi dilakukan dengan DMSO dan sentrifugasi. Pada kedua metoda pre ekstraksi ini diperoleh hasil negatif tidak sempurna, karena masih terlihat *band* halus yang kemungkinan merupakan kontaminan (3). Dari hasil yang diperoleh pada studi ini dapat disimpulkan bahwa dengan pre ekstraksi Trizol diperoleh hasil yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. 2011. DMSO. Available at <http://www.qbiogene.com/products/pcr/dmso.shtml>: 1. Diunduh pada 15 Maret 2011.
2. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol Chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.

3. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.:6.3
4. **Kolodziejek J, Nowotny N.** 2002. Comparison of PCR Kleen™ Spin Columns to Traditional Methods for Purification of PCR Products Prior to Sequencing, Rev A. Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Vienna, Veterinaerplatz 1, A-1210 Vienna, Austria.: 1.
5. **Michael AI, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ.** 1990. PCR Protocol. Academic Press, Inc. London.:1
6. **Spackman E.** 2007. Avian Influenza Virus. Humana Press, Athens, Georgia: 19.