

ANALISIS KEMURNIAN EKSTRAKSI ASAM RIBONUKLEAT
PADA SAMPEL DARAH MENSTRUASI

*ANALYSIS OF RIBONUCLEIC ACID EXTRACTION PURITY IN MENSTRUAL
BLOOD SAMPLES*

Info artikel Diterima: 19 Agustus 2022 Direvisi: 30 November 2022 Disetujui: 28 Desember 2022

Oktariyana¹, Dian Lestari², Asmarinah³

^{1,2} Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang.

³ Universitas Indonesia. Jakarta

(e-mail korespondensi penulis: oktariyana@poltekkespalembang.ac.id)

ABSTRAK

Latar Belakang: Asam nukleat mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. Asam nukleat yang paling umum adalah Asam deoksiribonukleat (ADN) dan Asam ribonukleat (ARN). Untuk mengeluarkan ARN dari dalam intisel maka diperlukan suatu teknik isolasi. Suatu ekstraksi asam nukleat dikatakan baik jika dari prosedur yang dilakukan bisa didapatkan asam nukleat yang murni dan utuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana tingkat kemurnian ekstrak asam nukleat dari sampel darah menstruasi menggunakan teknik isolasi asam nukleat.

Metode: Sampel darah menstruasi dikumpulkan dengan cara ditampung pada kertas saring yang di desain khusus. Sampel akan diekstraksi menggunakan Quick-ARN Miniprep Plus Kit R1058 Zymo Research untuk isolasi ARN, selanjutnya diukur tingkat kemurnian dengan menggunakan alat nanodrop berdasarkan prinsip spektrofotometri. Data diolah secara statistic dengan menggunakan analisis deskripsi dalam disajikan dalam bentuk distribusi frekuensi dan nilai rerata.

Hasil: pada penelitian ini diperoleh bahwa rerata tangka kemurnian ARN sampel darah menstruasi yang ditampung pada kertas saring pada Panjang gelombang A260 / A280 adalah 2,07, dan Panjang gelombang A260 / A230 adalah 2,1.

Kesimpulan: Isolasi ARN pada sampel darah menstruasi yang ditampung di kertas saring memiliki tingkat kemurnian yang optimal.

Kata Kunci: Asam ribonukleat, isolasi ARN, menstuasi.

ABSTRACT

Background: Nucleic acids contain genetic material and regulate the entire development of cellular life forms. Deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) are the most common nucleic acids. An isolation technique is needed to remove RNA from the nucleus. This study aims to determine the purity level of nucleic acid extracts from menstrual blood samples using modification nucleic acid isolation techniques.

Methods: Menstrual blood samples were collected on specially designed filter paper. The sample will be extracted using Zymo Research's Quick-ARN Miniprep Plus Kit R1058 to isolate RNA; The purity level was measured using a nanodrop device based on spectrophotometric principles. The data were statistically processed using descriptive analysis using frequency distribution and an average value.

Results: In this study, the average RNA purity of menstrual blood samples collected on filter paper at A260/A280 wavelength was 2.07, and A260/A230 wavelength was 2.1.

Conclusion: The RNA isolation in menstrual blood samples in the filter paper of this study was optimal purity.

Keywords : Nucleic acids; RNA extraction; Menstrual.

PENDAHULUAN

Menstruasi adalah perdarahan vagina secara berkala akibat terlepasnya lapisan endometrium uterus. Fungsi menstruasi normal merupakan hasil interaksi antara hipotalamus, hipofisis, dan ovarium dengan perubahan-perubahan terkait pada jaringan sasaran pada saluran reproduksi normal, ovarium memainkan peranan penting dalam proses ini, karena tampaknya bertanggung jawab dalam pengaturan perubahan-perubahan siklik maupun lama siklus menstruasi. (1)

Darah menstruasi merupakan cairan tubuh kompleks yang terdiri atas sel endometrium, sel imun tubuh, cairan vagina, dan darah. Cetakan epigenetik dapat diperoleh dari tumor, biopsi, darah, dan komponen biologis lainnya. (2) Sebelumnya, Suatu penelitian telah menggunakan darah menstruasi sebagai sampel untuk menganalisis keberadaan jenis sel T pada endometrium. (3) Pengeluaran darah menstruasi terdiri dari fragmen-fragmen kelupasan endometrium yang bercampur dengan darah yang banyaknya tidak tentu. Biasanya darahnya cair. Rata-rata banyaknya darah yang hilang selama satu periode menstruasi sekitar 25-60ml. Darah menstruasi juga digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi biomarker melalui teknik analisis spektrometri (4) Selain itu terdapat banyak protein yang juga diekspresikan dalam peluruhan sel endometrium selama proses menstruasi. (5)

Protein dalam darah menstruasi memiliki potensi untuk menjadi biomarker noninvasif yang selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk diagnosis dini. Namun belum diketahui bagaimana sampel darah menstruasi dapat menjadi salah metoda diagnostik berdasarkan aspek molekuler.

Sel mamalia mengandung ARN sebesar 10-5 µg, 80-85% dari total ARN adalah rARN dan sisanya 15-20% terdiri dari berbagai ARN dengan berat molekul yang rendah seperti tARN dan snARN. Isolasi ARN digunakan untuk memisahkan RNA dari zat lain sehingga menghasilkan RNA murni dari zat-zat dan molekul lainnya seperti DNA, lipid, protein, dan karbohidrat. (6)

Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menganalisis tingkat kemurnian isolat RNA sampel darah menstruasi yang ditampung pada kertas saring.

METODE

Subjek penelitian berjumlah 16 orang Wanita dalam keadaan menstruasi hari kedua, darah menstruasi akan ditampung dengan terlebih dahulu membersihkan daerah genitalia sampai benar bersih dan kering, kemudian darah menstruasi subjek penelitian ditampung pada pembalut yang sudah di desain khusus, cara pemakaiannya sama seperti penggunaan pembalut pada umumnya. Pembalut dipasang pada celana dalam selama sekitar 30 menit, setelah darah tertampung dalam diameter 10 cm maka pembalut dikeringkan sampai benar-benar kering, lalu ditempatkan pada kantong yang telah disediakan.

Isolasi ARN mengikuti prosedur yang telah dipatenkan oleh Ocktariyana dan Asmarinah dengan nomor registrasi: 500201910022.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian ARN dilakukan dengan menggunakan NanoDrop. Alat nano drop yang digunakan dikoneksikan pada perangkat komputer. Sebelum meletakkan 1 µl sampel ARN pada NanoDrop, terlebih dahulu teteskan 1 µl ARN Elution Buffer sebagai blanko. Prinsip teknik spektrofotometri diterapkan dalam alat NanoDrop.

Tingkat kemurnian asam nukleat dapat diestimasi melalui penentuan nisbah $\lambda 260$ terhadap $\lambda 280$. ARN murni mempunyai nisbah $\lambda 260 / \lambda 280$ sekitar 2,0.

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan membedakan data berdasarkan sebaran data yang diperoleh. Jika diperoleh sebaran data normal, maka untuk menganalisis perbedaan antara tingkat kemurnian isolat asam nukleat antara Subjek dismenoreadan tanpa endometriosis, digunakan analisis statistik uji T-Independent. Namun, jika diperoleh sebaran data tidak normal, maka untuk menganalisis perbedaannya digunakan uji Mann-Whitney.

HASIL

Pada penelitian ini diperoleh hasil kemurnian asam ARN dari 16 sampel darah menstruasi. Penelitian dilakukan isolasi ARN dari sampel darah menstruasi menggunakan Teknik lisis bertingkat dan beberapa modifikasi pada volume buffer dan prinsip sentrifugasi. Sampel yang telah diisolasi

memiliki konsentrasi dan tingkat kemurnian

yang bervariasi sebagaimana tabel berikut ini:

Sampel	Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian ARN	
		260/280	260/230
1	65,7	2,08	2,00
2	173,4	2,03	2,07
3	138,5	2,2	2,11
4	59,9	2,00	2,15
5	57,9	2,27	2,06
6	86,5	2,00	2,15
7	166,3	2,02	2,04
8	63,8	2,04	2,11
9	62,8	2,01	2,13
10	112,3	2,01	2,18
11	178,9	2,14	2,06
12	86,5	2,00	2,01
13	150,6	2,1	2,13
14	186,6	2,09	2,23
15	100,6	2,10	2,11
16	186,6	2,09	2,00
	Rerata	2,07	2,10

Berdasarkan diatas diketahui bahwa nilai rerata kemurnian ARN pada Panjang gelombang 260/280 sebesar 2,07 dan pada Panjang gelombang 260/230 sebesar 2,10.

PEMBAHASAN

Penelitian-penelitian sebelumnya yang menjelaskan bahwa darah menstruasi dapat dianalisis dalam melekuler. Harapannya dalam darah menstruasi mengandung endometrium. Suatu penyakit yang berhubungan dengan gangguan endometrium adalah penyakit endometriosis.(7),(8),(9),(10) Patogenesis utama dari diagnosis kasus endometriosis adalah ditemukannya serabut saraf pada lapisan fungsional endometrium melalui laparoskopi dan biopsi, dimana serabut saraf tersebut tidak ditemukan pada wanita tanpa endometriosis. Selain itu, wanita endometriosis cenderung mengalami peningkatan kepadatan serabut saraf pada lapisan basal endometrium, miometrium, dan peritoneum. (11),(12),(13) Diketahuinya patogenesis endometriosis melalui mekanisme epigenetik metilasi DNA, memudahkan

Selain itu tingkat konsentrasi yang diperoleh pada sampel darah menstruasi terkecil adalah 57,9 ng/μl dan yang terbesar 186,6 ng/μl.

penentuan diagnosis dini dan prediksi pengobatan jangka panjang. Mekanisme metilasi DNA juga diharapkan dapat membantu pengembangan biomarker epigenetik. Sebab, sejauh ini, prosedur diagnosis secara non-invasif seperti biomarker serum belum dapat ditemukan, sehingga diagnosis dari kasus endometriosis hanya dapat dilakukan dengan visualisasi langsung melalui laparoskopi dan biopsi.(14) Bagi wanita yang belum menikah, prosedur diagnosis tersebut tentunya tidak memungkinkan untuk diterapkan, sehingga menampung darah menstruasi yang mengandung endometrium dianggap rasional untuk.mendapatkan materi genetic ARN sebagai identifikasi beberapa biomarker penyebab penyakit endometriosis.

Pada penelitian ini hasil kemurnian isolate ARN darah mentruasi memiliki tingkat

kemurnian yang optimal. Keberhasilan Teknik isolasi asam nukleat ini sangat ditentukan oleh beberapa hal antara lain isolasi sel, lisis dinding membran, ekstraksi larutan, purifikasi, dan presipitasi.(15) Selain itu prinsip sentrifugasi juga menentukan tingkat kemurnian isolasi ARN pada penelitian ini.

Nilai rasio $\lambda 260/\lambda 230$ dapat digunakan untuk membantu mengevaluasi keberadaan senyawa garam, protein, guanidin HCL, EDTA, lipid, dan fenol. Semakin rendah nilainya, semakin tinggi jumlah kontaminan (16) Namun, nilai konsentrasi tinggi belum tentu nilai kemurniaannya tinggi. Jika nilai $\lambda 260$ yang merupakan nilai untuk ARN tinggi maka nilai konsentrasi akan tinggi. Nilai kontaminan untuk kemurnian ARN dipengaruhi oleh nilai $\lambda 280$ sehingga meskipun nilai konsentrasi ARN tinggi bukan berarti nilai kemurnian akan tinggi juga.(17)

ARN memiliki struktur berantai tunggal yang tersusun atas monomer-monomer nukleotida dengan gula ribose. ARN merupakan polimer yang disebut polinukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu basa nitrogen, gula pentose, dan gugus asam fosfat. Basa nitrogen pada ARN terdiri dari atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincin-ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan Urasil (U). Urutan basa nitrogen dapat tersebut dapat mengkode informasi genetik. (18)

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolasi ARN pada sampel darah menstruasi yang ditampung di kertas saring dengan teknik lisis bertingkat memiliki tingkat kemurnian yang optimal.

Saran dalam penelitian ini adalah perlu dilakukan pemeriksaan dengan jumlah sampel yang lebih banyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terima kasih kepada Direktur Poltekkes Kemenkes Palembang dan jajarannya, Ketua Jurusan Kebidanan Poltekkes Kemenkes Palembang dan tim peneliti.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sukarmi, Margareta. Kehamilan, Persalinan, dan Nifas. Yogyakarta: Nuha Medika; 2013.
2. Moylan C, Murphy S. DNA methylation: basic principles. In: Tollefsbol T, editor. Medical epigenetics. London: Academic Press Elsevier; 2016. p. 11–31.
3. Al-Sabbagh M1, Lam EW BJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012;352(2):208–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085558>
4. Hawthorn A, Kleidon T, Larsen E, Marsh N, Marshall A, Ray-Barruel G, et al. Peripheral Intravenous Catheter Protection : Br J Nurs [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 9];30(February):28. Available from: https://www.health.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0025/444490/icare-pivc-guideline.pdf
5. Yang H, Zhou Y, Edelhain B, Schatz F, Lockwood CJ, Taylor HS. FKBP4 is regulated by HOXA10 during decidualization and in endometriosis. *Reproduction*. 2012;
6. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning Vol1, 2, 3*. New York, USA: Springs Harbor Lab Press: Long Island; 2001.
7. Zahrah A, Muharam R, Luky Satria Marwali M, Ocktariyana, Deraya IE, Asmarinah. mRNA expression and DNA methylation level of the MMP-2 gene in peritoneal endometriosis. *J Pak Med Assoc*. 2021;71(2):S112–5.
8. Zahrah A, Muharam R, Marwali MLS, Sururi A, Harzif AK, Pratama G, et al. Analysis of DNA methylation and its correlation with mRNA expression of epidermal growth factor receptor encoding for cytoskeleton regulating protein in peritoneal endometriosis tissue. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020;457(1).
9. Ocktariyana, Hikmawati N, Hestiantoro A, Muharam R, Luky Marwali M, Surur A, et al. Analysis of DNA methylation level and mRNA expression of Transient Receptor Ankyrin Member 1 (TRPA1) in

- endometriosis-associated pain. *AsPac J Mol Biol Biotechnol.* 2021;29(3):1–10.
10. Deraya IE, Hestiantoro A, Muharam R, Marwali ML, As'adi AS, Darmawi, et al. Analysis of mrna expression and dna methylation level of rac1 gene encoding focal adhesion molecule in endometrial and peritoneal endometriosis. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol.* 2020;28(2):43–9.
 11. Ocktariyana, Hestiantoro A, Rahmala R, Asmarinah. DNA methylation of P2X3 receptor gene encoded pain marker protein in endometriosis. *J Phys Conf Ser.* 2019;1246(1).
 12. Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, et al. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: A double blind study. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3019–24.
 13. Ocktariyana. Nyeri pada endometriosis dalam perspektif molekuler. 1st ed. Kediri, Indonesia: Chakra Brahmanda Lentera; 2020. 1–64 p.
 14. Guo S-W. The Epigenetics of Endometriosis. In: *Epigenetics in Human Disease* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 443–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123884152000226>
 15. Dale J., Schantz MV. From genes to genomes. Canada: John Wiley & Sons, Ltd; 2002. xi + 360.
 16. JT M, EN O. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012;148(6):1172–87.
 17. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Oct 10];14(4):264–70. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2015.0064>
 18. Chambell NA. *Biologi Jilid 2.* Jakarta: Erlangga. 2002;