

Optimasi Perolehan DNA Mikrobioma yang Diekstraksi dari Mekonium dan Feses Neonatus Prematur untuk diaplikasikan pada *Next-Gen Sequencing* 16S rRNA

(Optimization of Microbiome DNA Yield Extracted from Meconium and Feces of Preterm Neonates to be applied in 16S rRNA Next-Gen Sequencing)

LARASHINTYA RULITA¹, AMARILA MALIK^{1*}, RADHIAN AMANDITO²,
RINAWATI ROHSISWATMO²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, 16424, Jawa Barat, Indonesia.

²Departemen Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM)-FKUI,
Jl. Diponegoro No.71, Jakarta Pusat, Daerah Khusus Ibukota Jakarta, 10430.

Diterima 30 Juni 2021, Disetujui 14 Oktober 2021

Abstrak: Komposisi mikrobioma usus pada neonatus prematur dapat diidentifikasi dari mekonium dan feses dengan teknologi *Next-Generation Sequencing* (NGS). Akan tetapi, perolehan DNA mikrobioma sampel mekonium dan feses memiliki tantangan karena konsistensi serta kandungan inhibitor PCR yang tinggi pada sampel tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimasi perolehan DNA mikrobioma dari mekonium dan feses neonatus. Proses perolehan DNA dilakukan dengan menerapkan optimasi parameter yaitu pertimbangan tahap *pra*-ekstraksi yaitu replikasi dan kondisi sampel, penggunaan pilihan *kit* ekstraksi, dan tahap elusi DNA hasil ekstraksi. DNA genomik yang diperoleh dikuantifikasi serta dikonfirmasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction*. Hasil optimasi terbaik berdasarkan pengamatan visual kualitas DNA dengan agarose gel dan transiluminator UV, maupun secara kuantitas yang diukur dengan spektrofotometer nano adalah dengan replikasi jumlah sampel sebanyak 2 kali lipat, menggunakan sampel mekonium dan feses yang segar, dan terlebih dahulu disuspensikan menggunakan ddH₂O untuk tahap-tahap *pra*-ekstraksi. Kit terbaik untuk ekstraksi DNA adalah *MP Biomedical Fast DNA Spin Kit for Soil*, serta penggunaan dapar elusi dengan volume yang lebih sedikit untuk menghasilkan konsentrasi serta kemurnian DNA yang lebih tinggi. Dapat disimpulkan bahwa perolehan DNA yang andal terutama dari sampel mekonium berhasil teroptimasi untuk memenuhi kualitas dan kuantitas DNA untuk tahap selanjutnya dengan teknologi sekuensing mikrobioma.

Kata kunci: feses, mekonium, mikrobioma, mikrobiota, neonatus, NGS.

Abstract: The composition of the intestinal microbiome of neonates can be identified from meconium and feces by Next-Generation Sequencing (NGS) technology. However, the yield of microbiome DNA of meconium and feces has its own challenges due to the consistency and the high content of PCR inhibitors in these samples. This study aims to optimize the yield of microbiome DNA from meconium sample and feces of pre-term neonates. The DNA yield was obtained by applying certain optimized parameters, i.e., considering the replication and condition of the sample, using a particular kit for DNA extraction, and modifying the DNA elution of the column purification. The genomic DNA obtained was quantified and confirmed using Polymerase Chain Reaction. Results showed that the best DNA yield was achieved by replicating the number of samples twice in the pre-extraction stage, working on fresh meconium and feces samples instead, and suspended the sample in ddH₂O prior to extraction process as observed on agarose gel visualization with UV trans-illuminator, as well as in quantitative measurement by a nano spectrophotometer. The best extraction process was using MP Biomedical FastDNA Spin Kit for Soil, in addition to the use of an elution buffer in a smaller volume, resulting in a higher concentration and purity of DNA. In conclusion, we were able to obtain an optimized yet reliable DNA yields, especially from meconium, which fulfilled the quality and quantity requirement for further sequencing process of microbiome.

Keywords: feces, meconium, microbiome, microbiota, neonates, NGS.

PENDAHULUAN

KOLONISASI mikrobiota dalam saluran pencernaan memainkan peran penting dalam mempertahankan homeostasis usus karena mikrobiota usus terlibat dalam proses pencernaan, penyerapan nutrisi, dan mekanisme imunologis⁽¹⁾. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi komposisi dan keragaman mikrobiota dalam saluran pencernaan neonatus adalah usia kehamilan, diet ibu selama kehamilan, paparan antibiotik, dan cara persalinan. Perkembangan koloni mikrobiota di awal kehidupan neonatus berbeda antara individu dan terkait dengan status kesehatan individu di kemudian hari⁽²⁾.

Adanya informasi tentang mikrobiota usus neonatus dapat memberikan wawasan tentang akuisisi mikrobiota awal, perkembangan selanjutnya, dan peluang potensial untuk intervensi terkait dengan kesehatan neonatus di masa depan⁽³⁾. Bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang terkandung dalam mikrobiota mekonium berfungsi sebagai mediator untuk meningkatkan sistem imun sehingga dapat membantu mencegah perkembangan penyakit pada neonatus⁽⁴⁾.

Mekonium adalah bahan dan hasil sekresi yang tertelan oleh janin di saluran pencernaan saat di dalam kandungan yang mengandung campuran dari asam empedu, sekresi pankreas, sel epitel, dan residu dari cairan amnion yang tertelan⁽⁵⁾ dan merupakan feses pertama dari neonatus yang dikeluarkan pada waktu 24–48 jam setelah kelahiran⁽⁶⁾. Mekonium dan feses dapat dianalisis sebagai metode *non-invasif* untuk mempelajari profil mikrobiota pada lingkungan *in-utero* dan pada saluran pencernaan neonatus. Akan tetapi, terdapat beberapa faktor yang mempersulit proses ekstraksi sampel mekonium dan feses ini.

Mekonium mengandung berbagai mikrobiota yang beragam dengan konsentrasi biomassa yang rendah^(2,7-10) sehingga sulit untuk memperoleh DNA mikrobiota yang optimal dari mekonium. Selain itu, konsistensi mekonium yang seperti tar (lengket) dan konsistensi feses yang terkadang padat menyebabkan kedua sampel ini sulit untuk diekstraksi karena kelarutannya yang rendah. Faktor lain yaitu adanya inhibitor PCR yang terkandung di dalam mekonium maupun feses dengan konsentrasi yang cukup tinggi seperti garam empedu dan asam, glikolipid, serta urea sehingga perolehan DNA mikrobiota dari PCR rendah^(5,11).

Pada penelitian ini, untuk meningkatkan keberhasilan perolehan DNA dari mekonium dan feses maka dilakukan optimasi pada tahapan pemilihan *kit* ekstraksi, pengkondisian sampel, replikasi, preparasi, dan elusi sampel untuk mengatasi faktor-faktor yang

mengganggu hasil perolehan DNA tersebut. Optimasi yang dilakukan yaitu dengan menggunakan 2 *kit* ekstraksi berbeda, pengkondisian sampel (segar/beku) dan jumlah sampel dengan melakukan replikasi, penambahan tween-80 dan ddH₂O untuk melarutkan sampel, serta membandingkan volume dapar elusi.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi ekstraksi DNA mikrobiota dari mekonium dan feses neonatus yang optimum dengan hasil termurni dan terbanyak berdasarkan optimasi yang dilakukan. DNA hasil ekstraksi akan diukur kualitas dan kuantitasnya agar terpenuhi untuk keperluan sekuensing 16S rRNA dengan teknologi *Next-Generation Sequencing*. DNA hasil ekstraksi dari sampel mekonium dan feses dikuantifikasi, divisualisasi, dan selanjutnya diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan adalah *DNeasy® PowerSoil® Kit* [Qiagen, Jerman], *FastDNA™ Spin Kit for Soil* [MP Biomedical, Amerika Serikat] dapar Tris-EDTA, Etidium Bromida [Merck, Jerman], Agarosa [Affymetrix, Amerika Serikat], KOD Fx Neo [Toyobo, Jepang], penanda DNA 1 kb [Biospec, Amerika Serikat], penanda DNA 100 bp [BioLabs, Amerika Serikat], bromtimol biru (loading dye) [BioLabs, Amerika Serikat], Aquadest, dan ddH₂O. Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA hasil ekstraksi dengan menggunakan PCR yaitu 27F (primer *forward* 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dan 534R (primer *reverse* 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG -3') [Integrated DNA Technology, Coralville] dengan target gen 16S rRNA region hipervariabel V1-V2-V3⁽¹²⁾.

Alat. Alat yang digunakan tidak lazim disertakan untuk naskah hasil riset ini. Namun dapat disebutkan yang utama adalah: Alat yang digunakan antara lain tube feses steril, Vorteks mixer [Barnstead, Amerika Serikat], UV-transilluminator [Biometra, Jerman], alat elektroforesis gel agarosa [Mupid, Jepang], NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Freezer -20oC [GEA, Indonesia], dan alat-alat pendukung lain.

METODE. Sampel Penelitian. Sampel penelitian adalah mekonium dan feses dari subjek 14 neonatus prematur yang lahir pada Januari 2020-Maret 2020 di Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta. Kriteria inklusi adalah neonatus yang lahir pre-term dengan usia 32-34 minggu dan berat kurang dari 2.500 g dengan proses persalinan normal dan persalinan dengan bedah cesar, sampel mekonium yang dikeluarkan dari neonatus dalam 24 - 48 jam

pertama setelah kelahiran, serta sampel feses hari ke-4 dan ke-7 setelah kelahiran.

Sampel mekonium dan feses dikumpulkan dari popok dan ditempatkan di tabung steril oleh perawat yang sudah terlatih. Semua sampel disimpan pada suhu 4 °C. Sampel dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia dengan menggunakan *ice box* untuk dilakukan ekstraksi DNA.

Etika Penelitian. Sebelum melakukan pengambilan sampel dilakukan pengajuan kaji etik ke Komite Etik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, dan mendapat persetujuan (ND-103 / UN2. F1 / ETIK / PPM.00.02 / 2020, No. Protokol Etik 19-02-0163).

Optimasi Perolehan DNA. Parameter yang dioptimasi pada tahap ini yaitu:

1. Replikasi Sampel

Dalam penelitian ini, sampel mekonium ditimbang pada 2 mikrotub yang berbeda masing-masing ± 100 mg dan dilakukan ekstraksi DNA. Pada tahap pengikatan DNA, filtrat dari 2 mikrotub yang berbeda dimasukkan kedalam 1 kolom yang sama untuk selanjutnya dilakukan elusi DNA.

2. Kondisi Sampel

Optimasi berdasarkan kondisi sampel yaitu menggunakan sampel segar dan sampel beku. Sampel segar diekstraksi kurang dari 48 jam setelah mekonium dikeluarkan dari neonatus yang sebelumnya disimpan pada suhu 4 °C dan sampel beku adalah sampel yang disimpan pada suhu -20 °C lebih dari 48 jam setelah dikeluarkan dari neonatus.

3. Tahap Preparasi Sampel

Optimasi pada tahap ini dilakukan dengan membandingkan 2 jenis pelarut yaitu ddH₂O dan tween-80 konsentrasi 10% dalam melarutkan sampel mekonium dan feses⁽¹⁵⁾. Pelarut tersebut ditambahkan sebanyak 1 mL kedalam mikrotub yang berisi sampel sebanyak ± 100 mg. Kemudian mikrotub divortex dengan kecepatan maksimum selama 20 menit kemudian disentrifugasi selama 9 menit pada 13.000 g.

4. Pemilihan Kit Ekstraksi

Optimasi perolehan DNA mikrobiota mekonium dan feses berdasarkan pemilihan kit ekstraksi dilakukan dengan membandingkan konsentrasi DNA yang dihasilkan dari ekstraksi menggunakan *Qiagen DNeasy® PowerSoil® kit dengan MP Biomedicals FastDNA™ Spin Kit for Soil*.

5. Tahap Elusi DNA

Optimasi pada tahap ini dilakukan dengan

mengubah volume dapar yang digunakan untuk mengelusi DNA. Berdasarkan protokol, volume dapar elusi yang ditambahkan yaitu sebesar 100 μ L dan optimasi yang dilakukan pada penelitian ini dengan menambahkan dapar elusi sebanyak 60 μ L, 40 μ L, dan 30 μ L.

Ekstraksi dan Kuantifikasi DNA. Sampel mekonium dan feses yang telah diproses *pre*-ekstraksi maupun proses ekstraksi secara optimum di atas, dilanjutkan dengan aplikasi proses ekstraksi DNA untuk keseluruhan sampel mekonium dan feses. DNA genomik yang diperoleh dikuantifikasi menggunakan NanoDrop™ *One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*.

Polymerase Chain Reaction gen 16S rRNA.

Pengujian kualitas DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen 16S rRNA dengan menarget region V1 – V3 dari 16S rRNA⁽¹²⁾ dilakukan dengan menggunakan dua primer universal: 27F (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3 ') dan 534R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (IDT DNA, Singapore). Campuran reaksi PCR dilakukan dengan total volum 50 μ L terdiri dari 6,5 μ L ddH₂O, 25 μ L dari 2X FX Neo Dapar (Toyobo, Jepang), 10 μ L dari 2-mM dNTPs, masing-masing 0,75 μ L dari 10 pmol/ μ L primer 27F dan 534R, 6 μ L DNA genomik sebagai cetakan (konsentrasi 14,304 ng/6 μ L-1.931,75/6 μ L), dan 1 μ L KOD FX Neo polimerase (Toyobo, Jepang). PCR dilakukan dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, penempelan pada suhu 63 °C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 68 °C selama 40 detik, dan pemanjangan akhir pada suhu 68 °C selama 6 menit. Tahap denaturasi hingga pemanjangan diulang sampai 30 siklus⁽¹³⁾.

Visualisasi DNA Genomik dan Amplikon.

DNA genomik hasil ekstraksi dan produk PCR (DNA amplikon) dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dengan penanda DNA 1 kb (Biospec, Amerika Serikat) sebagai pembanding hasil ekstraksi, dan penanda DNA 100 bp (BioLabs, Amerika Serikat) sebagai pembanding hasil PCR. Alat elektroforesis disambungkan ke sumber listrik dan diatur dengan kondisi tegangan listrik 100 Volt selama 30 menit. Visualisasi pita-pita DNA hasil elektroforesis dilakukan dengan sistem dokumentasi menggunakan UV transilluminator.

Tabel 1. Hasil optimasi replikasi sampel untuk perolehan DNA.

Kode Sampel	Optimasi	Hasil Kuantifikasi	
		Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
JUW 1.3	- 1x ekstraksi (sampel 100 mg/kit)	2.429	1.358
JUW 2.3 + 3.3	- Dilakukan replikasi: 2x ekstraksi (sampel @100 mg/kit → <i>pooled</i>)	10.327	1.584

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Perolehan DNA. Hasil dari perolehan DNA, yaitu:

1. Replikasi Sampel

Hasil optimasi pada Tabel 1 menunjukkan bahwa konsentrasi sampel dengan perlakuan replikasi lebih tinggi dibandingkan sampel tanpa replikasi.

Ekstraksi pada tahap ini menggunakan kit Qiagen DNeasy® PowerSoil® Kit. Sampel JUW 2.3+3.3 yang dioptimasi dengan replikasi mengandung

jumlah sampel yang lebih besar dimana total sampel yaitu sebanyak ±200 mg. Sampel yang direplikasi mengalami proses pelisisan sel, penghilangan inhibitor dan pengikatan DNA dua kali lebih besar daripada sampel yang tidak direplikasi, sehingga menyebabkan DNA yang terikat dengan membran silika pada kolom menjadi dua kali lebih banyak dan hasil DNA lebih konsentrat ketika dipooled setelah di elusi.

2. Pemilihan Kit Ekstraksi

Ekstraksi DNA dari sampel mekonium menggunakan *MP Biomedicals FastDNA™ Spin Kit*

Tabel 2. Hasil optimasi penggunaan *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit* dan *MP Bio FastDNA Spin Kit for Soil*.

Kode Sampel	Hasil Kuantifikasi	
	Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
MIR (M)	15.0	0.92
ADS (M)	8.6	1.37
MAH (M)	3.9	1.07
AJM (M)	14.46	1.43
F_MIR (M)	22.96	1.85
F_ADS (M)	10.8	2.15
F_MAH (M)	27.74	1.40
F_AJM (M)	24.7	1.70

for menghasilkan konsentrasi dan kemurnian DNA yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan *Qiagen DNeasy® PowerSoil® Kit* dengan rasio konsentrasi rata-rata 2,6:1. Tabel 2 menunjukkan perbedaan hasil optimasi menggunakan sampel yang sama dengan 2 kit ekstraksi berbeda. Pada tabel tersebut, kode sampel berawalan huruf "F" merupakan sampel yang diekstraksi menggunakan *MP Bio FastDNA Spin Kit for Soil*.

Perbedaan antara kedua kit yang digunakan adalah *Qiagen DNeasy PowerSoil kit* menggunakan *Inhibitor Removal Technology (IRT)* yaitu reagen yang mampu mengendapkan bahan-bahan organik dan anorganik non-DNA termasuk zat humat, sel debris, dan protein yang merupakan inhibitor PCR.

Proses pelisisan dilakukan secara mekanis dengan *bead beating* dan secara kimia dengan larutan C1 yang mengandung *Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)*. Sementara *FastDNA Spin Kit For Soil* menggunakan

tabung *Lysing Matrix*, campuran partikel keramik, silika, dan manik-manik kaca yang dirancang untuk pelisisan sel dengan bantuan larutan dapar MT dan dapar *Sodium Phosphate*, reagen yang berfungsi melindungi dan melarutkan asam nukleat dan protein saat pelisisan sel. Kedua kit ini menggunakan *bead beating* dalam proses pelisisan sel. *Bead beating* menghasilkan perolehan DNA dan jumlah OTU yang lebih tinggi pada bakteri yang sulit untuk dilisiskan seperti bakteri gram positif⁽¹⁴⁾. Proses pengikatan DNA kedua kit ini menggunakan kolom dengan membran berbasis silika.

Berdasarkan efisiensi waktu, proses ekstraksi menggunakan *FastDNA Spin Kit for Soil* hanya membutuhkan waktu kurang dari 2 jam sementara *Qiagen DNeasy PowerSoil kit* membutuhkan proses yang lebih lama yaitu hingga 5 jam. Proses pelisisan menggunakan *bead beating* pada *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit* membutuhkan waktu 20 menit ketika

dihomogenkan dengan vorteks dengan kecepatan maksimum. Proses pelisisan sel dengan *bead beating* pada kecepatan yang lebih tinggi dan waktu lebih lama dapat menghasilkan lebih banyak DNA yang terdegradasi⁽¹⁵⁾.

Sampel yang diekstraksi menggunakan *MP Bio FastDNA Spin Kit for Soil* menghasilkan konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi karena menggunakan sejumlah besar bahan pengikat⁽¹⁶⁾. Proses pengikatan *MP Bio FastDNA Spin Kit for Soil* menggunakan suspensi *binding matrix* dengan waktu inkubasi selama 5 menit pada suhu 55 °C sehingga DNA akan berikatan dengan matriks silika karena adanya garam

chaotropic sebagai kondisi penyesuaian pengikatan DNA untuk kemudian berikatan dengan membran silika pada kolom. Teknik ini didasarkan pada prinsip pengikatan selektif DNA bermuatan negatif dengan permukaan silika yang dilapisi dengan ion bermuatan positif. Sementara itu, proses pengikatan DNA menggunakan *Qiagen DNeasy PowerSoil kit* hanya terjadi pada membran silika pada kolom dengan waktu inkubasi selama 10 menit yang menyebabkan proses pengikatan DNA menjadi kurang optimal. Pada *MP Bio FastDNA Spin Kit for Soil*, digunakan tabung falcon 15 mL sehingga proses pencampuran

Tabel 3. Hasil optimasi berdasarkan kondisi sampel.

Nama Sampel	Optimasi	Hasil Kuantifikasi	
		Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
F_MAH (M)	Sampel segar (disimpan kurang dari 48 jam)	27.749	1.406
F_MIR (M)		22.962	1.853
Fro_F_MAH (M)	Sampel beku (disimpan lebih dari 48 jam)	13.80	1.50
Fro_F_MIR (M)		10.50	1.80

dan pengikatan DNA dengan *binding matrix* akan lebih maksimal karena menggunakan tabung yang lebih besar.

3. Kondisi Sampel

Optimasi sampel mekonium berdasarkan kondisi sampel menggunakan *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Soil* pada Tabel 3 menunjukkan bahwa sampel segar menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi daripada sampel beku.

Hal ini karena pada sampel beku terjadi siklus pencairan beku dan fluktuasi suhu berulang. Siklus pencairan beku merupakan faktor utama penyebab degradasi DNA pada suatu sampel yang dapat menyebabkan kualitas DNA metagenomik buruk. Perubahan suhu yang signifikan juga merupakan tekanan bagi banyak mikrobiota di sampel, karena

dapat membunuh mikroba dan memperbesar degradasi DNA⁽¹⁷⁾.

Penelitian yang dilakukan oleh Panek *et al*⁽¹⁸⁾ mengidentifikasi penurunan rasio filum *Firmicutes/Bacteroidetes*, yang merupakan bakteri yang banyak terdapat di mekonium dan feses serta penurunan rasio *Lachnospiraceae* dan *Bacteroidaceae* ketika sampel dibekukan pada suhu -20 °C. Secara umum, hasil DNA genomik akan berkurang jika sampel disimpan pada 2-8 °C atau -20 °C tanpa perlakuan sebelumnya seperti penambahan gliserol atau media pengawet lainnya⁽¹⁹⁾.

4. Preparasi Sampel

Penambahan tween-80 10% sebanyak 1 mL untuk melarutkan sampel mekonium dan feses menghasilkan konsentrasi asam nukleat yang lebih kecil dibandingkan dengan sampel yang dilarutkan

Tabel 4. Hasil optimasi tahap preparasi sampel mekonium.

Kode Sampel	Optimasi	Hasil Kuantifikasi	
		Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
TRI (M)	- Dilakukan replikasi: 2x ekstraksi (sampel @100 mg/kit → pooled)	6.161	0.983
SUS (4)	- Penambahan ddH ₂ O 1 ml	57.041	1.797
(t) TRI (M)	- Dilakukan replikasi: 2x ekstraksi (sampel @100 mg/kit → pooled)	0.896	1.505
(t) SUS (4)	- Penambahan tween 80 10% 1 ml	4.113	1.765

dalam ddH₂O dengan rasio konsentrasi 6,8:1 pada sampel mekonium dan 13,8:1 pada sampel feses.

Tabel 4 menunjukkan perolehan hasil optimasi tahap preparasi sampel meconium. Konsentrasi asam nukleat yang diperoleh lebih rendah dengan adanya penambahan tween-80 10%, namun dengan kemurnian lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena tween 80 adalah surfaktan nonionik polisorbit, sebuah molekul yang memecah gumpalan lipid.

Molekul tween 80 akan mengikat lipid dan air, sehingga tween 80 mampu melarutkan atau melisiskan membran sel menyebabkan membran sel bakteri akan rusak dan DNA akan terbawa ke dalam larutan tween-80 10%⁽²⁰⁾. Bagian yang diambil untuk diproses lebih lanjut adalah bagian pellet bukan supernatan, sedangkan DNA sudah terlarut bersama dengan larutan tween-80 yang merupakan supernatan. Oleh karena itu, DNA yang dipreparasi dengan melarutkan dalam tween-80 10% menghasilkan konsentrasi yang

lebih rendah.

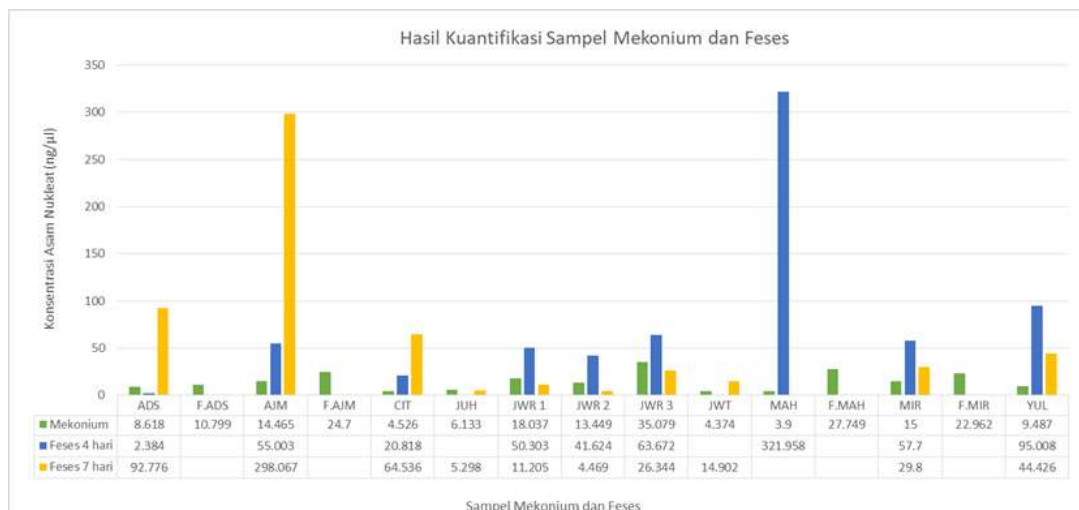
5. Tahap Elusi DNA

Elusi DNA menggunakan volume dapar elusi yang lebih sedikit menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi. Untuk memperoleh DNA genomik yang lebih pekat atau konsentrat, volume elusi dapat dikurangi sampai 35 µL. Jika volume kurang dari 35 µL digunakan untuk elusi, fraksi yang lebih besar dari dapar elusi akan tertahan, yang mengakibatkan hilangnya korelasi linear antara volume elusi dan hasil perolehan DNA⁽²¹⁾. Pada Tabel 5 menunjukkan adanya korelasi dimana semakin banyak volume dapar elusi yang ditambahkan ke membran pengikat DNA akan menghasilkan volume yang lebih banyak dengan konsentrasi yang lebih sedikit⁽²²⁾.

Kuantifikasi DNA Hasil Ekstraksi. Sampel DNA dikatakan murni ketika A260/280~1.8 – 2.0⁽²³⁾. Pada tahap kuantifikasi, rasio A260/280 yang kurang dari 1,8 menunjukkan sampel terkontaminasi residu

Tabel 5. Hasil optimasi berdasarkan volume dapar elusi.

Kode Sampel	Optimasi	Hasil Kuantifikasi	
		Kosentrasi (ng/µl)	Kemurnian (A260/A280)
JUW1.1	- 1x ekstraksi - Volume dapar elusi 60 µl	3.572	1.254
JUW2.1+3.1	- 2x ekstraksi - Volume dapar elusi 60 µl	6.894	1.05
JUW1.2	- 1x ekstraksi - Volume dapar elusi 40 µl	2.085	1.129
JUW2.2+3.2	- 2x ekstraksi - Volume dapar elusi 40 µl	9.018	1.302
JUW1.3	- 1x ekstraksi - Volume dapar elusi 30 µl	2.429	1.358
JUW2.3+3.3	- 2x ekstraksi - Volume dapar elusi 30 µl	10.327	1.584



Gambar 1. Konsentrasi perolehan DNA sampel mekonium dan feses.

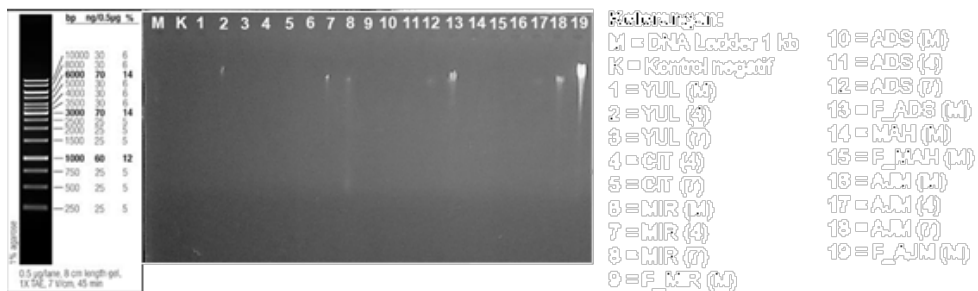


Gambar 2. Kemurnian perolehan DNA sampel mekonium dan feses.

senyawa fenolik, TRIzol, garam chaotropic (guanidine HCL, guanidine isotiosianat) atau reagen lain yang digunakan pada protokol ekstraksi. Sedangkan rasio A260/280 lebih dari 2,0 menunjukkan kualitas blanko yang buruk ketika blanking karena menghilangkan terlalu banyak serapan di dekat panjang gelombang 280 nm⁽²⁴⁾. Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan hasil kuantifikasi dan kemurnian seluruh sampel

mekonium dan feses.

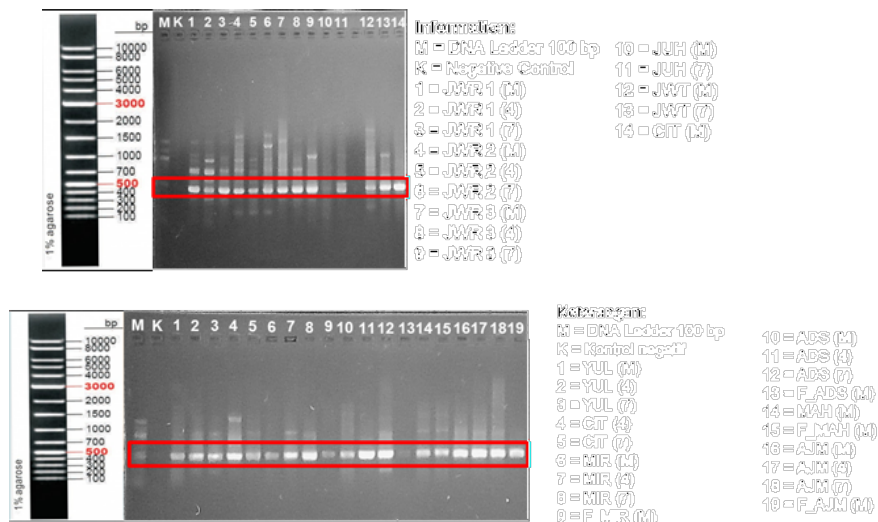
Visualisasi DNA Genomik dan Amplikon.
 Visualisasi DNA genom dan amplikon dilakukan untuk memastikan bahwa DNA dapat diekstraksi dari sampel mekonium dan feses dan DNA yang diamplifikasi sesuai dengan ukuran yang diharapkan ±500 bp. Hasil elektroforesis DNA genomik pada



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA genomik.

Gambar 3 menunjukkan bahwa pita DNA tidak terlihat jelas di semua sampel. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi DNA pada hasil ekstraksi yang masih terlalu kecil untuk dapat dideteksi dalam

gel elektroforesis. Selain itu, volume sampel yang ditambahkan cukup sedikit yaitu hanya 3 µL, sedangkan menurut literatur pada tahap preparasi sampel digunakan DNA sampel sebanyak 6 µL untuk



Gambar 4. Hasil elektroforesis amplikon.

dicampur dengan loading dye sebanyak 1 μL ⁽¹⁹⁾.

Sementara itu, pita DNA yang ditargetkan dari mekonium dan sampel feses dari produk yang diamplifikasi adalah 500 bp sesuai dengan area target yang diamplifikasi, V1-V3, yaitu sekitar 500 bp. Hasil elektroforesis pada DNA yang diamplifikasi dapat dilihat pada Gambar 4 menunjukkan pita DNA yang terlihat jelas hampir disemua sampel dan memiliki ukuran seragam sekitar 500 bp sesuai target.

Dari seluruh sampel tersebut, DNA sampel F_AJM (M) menunjukkan pita yang paling baik karena tidak adanya pita pengotor serta intensitas pita yang jelas. Sampel tersebut dioptimasi dengan dilakukan replikasi sebanyak 2 kali, dilarutkan dengan ddH₂O sebanyak 1 mL pada tahap preparasi sampel, menggunakan sampel segar, menggunakan volume dapar elusi sebanyak 30 μL , dan diekstraksi menggunakan *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Soil*. Secara keseluruhan, sampel yang diekstraksi menggunakan *Qiagen DNeasy PowerSoil* menghasilkan pita DNA target yang lebih jelas tetapi juga banyak pita pengotor jika dibandingkan dengan *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit*. Hal ini menunjukkan IRT (*Inhibitor Removal Technology*) yang digunakan oleh *Qiagen DNeasy PowerSoil* belum cukup baik jika dibandingkan dengan reagen PPS (*Protein Precipitation Solution*) yang digunakan oleh *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit* dalam mengendapkan inhibitor PCR yang terkandung didalam sampel mekonium dan feses neonatus.

Pita-pita pengotor menunjukkan kualitas dan kuantitas yang belum terbaik pada proses ekstraksi. Selain pita ampikon *non*-spesifik, noda (*smear*) di bagian bawah gel agarose menunjukkan tampilan RNA yang ada dalam sampel⁽²⁵⁾. Munculnya pita yang bukan pita DNA target selain karena hasil ekstraksi yang tidak murni, juga dapat dipengaruhi oleh suhu annealing yang masih terlalu rendah dan siklus PCR terlalu banyak. Jika suhu annealing lebih rendah dari suhu annealing ideal, sebagian besar primer akan menempel pada urutan DNA target spesifik. Tetapi ada beberapa primer yang menempel pada target yang tidak spesifik. Dalam kondisi tersebut, akan ada beberapa pita selain pita ampikon target yang muncul pada gel agarose⁽²⁶⁾. Jumlah siklus PCR yang terlalu banyak dapat menyebabkan *reannealing template* sehingga ampikon yang dihasilkan akan menyatu dan menjadi template untuk reaksi PCR berikutnya dan menyebabkan munculnya pita pengotor⁽²⁷⁾.

Munculnya pita kontaminan juga dapat disebabkan oleh dapar TAE (1 \times tris-acetate-EDTA) yang digunakan

dalam proses elektroforesis sudah tidak segar dan baru. Akibatnya, konsentrasi dapar akan berubah selama elektroforesis sehingga mengganggu proses migrasi DNA dan menyebabkan munculnya pita DNA kontaminan. Selain itu, kemungkinan fragmen DNA sisa proses elektroforesis sebelumnya yang belum tuntas terdegradasi berpotensi sebagai tampilan pita kontaminan ketika dapar TAE (1 \times tris-acetate-EDTA) yang sama digunakan kembali⁽²⁸⁾.

Walaupun demikian, DNA ampikon yang diperoleh pada penelitian ini sudah menunjukkan kualitas dan kuantitas memadai untuk dilakukan langkah selanjutnya yaitu *Next-Generation Sequencing* (NGS), dan dianggap dapat dipertanggungjawabkan keabsahannya. Namun, untuk menjamin kualitas analisis bioinformatik, maka pada analisis hasil NGS, data yang diperoleh tetap akan diterapkan tahap pembersihan data sehingga diperoleh data bersih (*Clean Data*)⁽²⁹⁾; data bersih tersebut kemudian akan diproses dalam beragam program analisis bioinformatika

SIMPULAN

Optimasi perolehan sampel DNA yang dilakukan menunjukkan perolehan paling baik yaitu dengan melakukan sebagai berikut: (i) replikasi sebanyak 2 kali, (ii) pelarutan dalam ddH₂O pada tahap preparasi sampel, (iii) penggunaan sampel segar, (iv) penggunaan volume dapar elusi yang lebih sedikit, dan (v) ekstraksi menggunakan *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Soil*. Sedangkan sampel terbaik hasil perolehan DNA nya adalah sampel mekonium dan feses AJM. DNA yang dihasilkan dari optimasi tersebut berupa DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi terutama untuk sampel mekonium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis menghaturkan terima kasih atas dukungan dana dparsial dari Hibah Riset UI 2020-2021- Pendampingan Publikasi Internasional Q1 (PPI Q1) dan Hibah Riset UI untuk Publikasi Internasional Q1 dan Q2 2019 (No. NKB-0194/UN2.R3.1/HKP.05.00/5522019) kepada AM dan RR. kepada A.M. Selain itu penulis juga sangat menghargai dukungan teknis perolehan DNA yang sangat bermakna dari D. Oktaviyani.

DAFTAR PUSTAKA

1. Moore TA, Hanson CK, and Anderson-Berry A. Colonization of the gastrointestinal tract in neonates: A review', *ICAN: Infant, Child, & Adolescent Nutrition*. 2011. 3(5):291–5. doi: 10.1177/1941406411421629.
2. Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS ONE* 8:e78257. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0078257
3. Browne PD and Cabana MD. *Microbiota: in health and disease: from pregnancy to childhood*. Wageningen Academic Publishers. 2017.
4. Oktaviyani D, Alawiyyah RZ, Nusaiba P, Malik A. a review: composition of neonatal meconium microbiota and its role for potential probiotic. *Pharmaceutical Science and Research (PSR)*. 2021. 8(1):15-29.
5. Stinson LF, Keelan JA, and Payne MS. Comparison of meconium DNA extraction methods for use in microbiome studies', *Frontiers in Microbiology*. 2018. p. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.00270.
6. Ardisson AN, Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth', *PLoS ONE*. 2014. 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0090784.
7. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol*. 2008. 159:187–193.
8. Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, and Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin. Exp. Allergy* 43. 2013. p. 198–211. doi: 10.1111/cea.12063
9. Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Pratico G, et al. Phylogenetic and metabolic tracking of gut microbiota during perinatal development. *PLoS ONE* 10:e0137347. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0137347
10. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, and Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* 6:23129. 2016. doi: 10.1038/srep23129
11. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal', *Journal of Applied Microbiology*, 113(5). 2012. p. 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
12. Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH, Nielsen PH. Back to basics – the influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities', *PLoS One*. 2015. p. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0132783.
13. Jonathan KJT, Ong G, Prasetyaningsih FA, Amandito R, Rohsiswatmo R, Malik A. Clinical characteristics influence cultivable-bacteria composition in the meconium of Indonesian neonates. *Heliyon* 6. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05576>
14. Videnska P, Smerkova K, Zwinsova B, Popovici V, Micenkova L, Sedlar K, et al. Stool sampling and DNA isolation kits affect DNA quality and bacterial composition following 16S rRNA gene sequencing using MiSeq Illumina platform', *Scientific Reports*. 2019. 9(1):1–14. doi: 10.1038/s41598-019-49520-3.
15. Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, and Zeyer JA. strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods* 45. 2001.p. 7–20.
16. Bollmann-Giolai A, Giolai M, Heavens D, Macaulay I, Malone J, Clark MD. A low-cost pipeline for soil microbiome profiling. *MicrobiologyOpen*. 2020. 9:e1133. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1133>
17. Wu WK, Chen CC, Panyod S, Chen RA, Wu MS, Sheen LY, et al. 'Optimization of fecal sample processing for microbiome study — The journey from bathroom to bench'. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018. doi:10.1016/j.jfma.2018.02.005
18. Panek M, Paljetak HC, Barešić A, Perić M, Matijašić M, Lojkić I, et al. Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci. Rep.* 2018. 8, 5143.
19. Qiagen. n.d. Considerations for isolation and quantification of both genomic DNA and plasmid DNA. Diambil dari: <https://www.qiagen.com/us/service-and-support/learning-hub/molecular-biology-methods/dna/>. Diakses 03 April 2020
20. Thermo Fischer. n.d. Detergents for cells lysis and protein extraction. Diambil dari: <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>. Diakses 03 April 2020.
21. New England Biolabs, Inc. Monarch® Genomic DNA Purification Kit Table of Contents. 2020. pp. 1–24. Diambil dari: <https://www.neb.com/-/media/neb/files/manuals/manualt3010.pdf?rev=358a9c46ee4141809ebfddacfdadd9b&hash=7220E4FEC910D7F0E1690DAD01735E8>. Diakses 06 April 2020.
22. Bychinski A. and Wiczorek D. The effects of decreasing elution volumes on plasmid DNA concentration and yield using Eluator™ Vacuum Elution Device'. Promega Corporation Web site. 2009. Diambil dari: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/the-effects-of-decreasing-elution-volumes-on-plasmid-dna-concentration-and-yield/>. Diakses 07 April 2020.
23. Pachchigar KP, Khunt A, Hetal Bhilocha. DNA quantification. *ICAR Sponsored summer school on Allele mining in crops: Methods and Utility*, 18th July-7th August, 2016.

24. Thermo Scientific. Interpreting Nanodrop (Spectrophotometric) Results. 2016. Diambil dari: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>. Diakses 04 April 2020.
25. Genetic Education. n.d. A complete guide for analysing and interpreting gel electrophoresis results. Diambil dari: <https://geneticeducation.co.in/a-complete-guide-for-analysing-and-interpreting-gel-electrophoresis-results/>. Diakses 07 April 2020
26. Shenghe C, Wei S, Zhaoxi Z, Jingyang L, Minjie D, Haiyan S. A weird DNA band in PCR and its cause. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding*. 2016. 5(1):2. doi: 10.7243/2050-2389-5-2.
27. Suzuki MT and Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR', *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 1996. Doi: 10.1128/aem.62.2.625-630.1996
28. Chauhan T. A complete guide for analysing and interpreting gel electrophoresis results. 2018. Diambil dari: <https://geneticeducation.co.in/a-complete-guide-for-analysing-and-interpreting-gel-electrophoresis-results/>. Diakses 07 April 2020.
29. Zhang M, Sun H, Fei Z, Zhan F, Gong X and Gao S, "Fastq_clean: An optimized pipeline to clean the Illumina sequencing data with quality control," 2014 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM), 2014, pp. 44-48, doi: 10.1109/BIBM.2014.6999309.