

Abstract

Background: Leptospirosis is an infectious zoonosis disease. Leptospirosis is often misdiagnosed. The diagnosis of leptospirosis can be done using urine as a specimen. The detection can be done via PCR method. The PCR method requires a reliable DNA template. Reliable DNA templates can be obtained from good DNA isolation methods. This study aimed to find out a good method of isolating leptospira DNA in urine that is represented by using a spike of urine.

Method: The method used in this study was the isolation of DNA from the urine spike by utilizing three isolation methods; silica based with spin column, spin column chromatography using resin as separation matrix and solution method with guanidine isothiocyanate. The results of urine DNA isolation are examined for their concentration and purity. Then Leptospira's presence was checked with real-time PCR.

Result: DNA isolation using resin in the first filtration process method showed the highest concentration ($46.7 \pm 19.35 \mu\text{g}/\text{mL}$) and leptospira amplified DNA (50167.92 ± 1.19) with Sec Y gene. DNA isolation from silica based with spin column showed a more positive tendency of quality and quantity in shelf life and storage. All methods showed purity value outside of considering value of A260/280. Storage temperature at 4° , -20° , and -80°C and lifetime of 91 days did not influence into the quality and quantity of leptospira DNA isolation product from spike urine.

Conclusions: DNA isolation using spin column chromatography with resin as separation matrix has the best quality and quantity based on the purity and concentration of DNA also highest number of amplified SecY gene specific Leptospira. DNA extraction with silica based with spin column showed stability of the DNA, requires a faster procedure and smallest specimen volume. Storage temperature at 4° , -20° , and -80°C and lifetime of 91 days did not have effect into quality and quantity on leptospira DNA isolation product from spike urine

Keywords: DNA isolation - Spike urine – leptospira diagnosis – leptospira DNA

Abstrak

Latar Belakang: Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang sering kali salah didiagnosis. Diagnosis leptospirosis dapat dilakukan dengan menggunakan urin sebagai spesimen. Deteksi dapat dilakukan melalui metode PCR. Metode PCR membutuhkan templat DNA yang dapat diandalkan. Template DNA yang baik dapat diperoleh dari metode isolasi DNA yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode terbaik untuk mengisolasi DNA leptospira dalam urin yang direpresentasikan dengan menggunakan spike urin.

Metode: Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi DNA dari spike urin dengan memanfaatkan tiga metode isolasi; silika dengan spin kolom, spin kolom kromatografi menggunakan resin sebagai matriks pemisahan dan metode solusi dengan guanidine isothiocyanate. Hasil isolasi DNA urin diperiksa konsentrasi dan kemurniannya. Kemudian gen *Leptospira* diperiksa dengan real-time PCR.

Hasil: Isolasi DNA menggunakan resin dalam metode proses filtrasi pertama menunjukkan hasil yang tinggi pada konsentrasi ($46,7 \pm 19,35 \mu\text{g} / \text{mL}$) dan DNA leptospira ($50167,92 \pm 1,19$). Isolasi DNA dari silika berbasis spin kolom menunjukkan kecenderungan kualitas dan kuantitas yang lebih positif dalam masa simpan dan suhu yang berbeda. Semua metode menunjukkan nilai kemurnian di luar mempertimbangan nilai A_{260} / A_{280} . Temperatur penyimpanan pada 4°C , -20°C , dan -80°C dan masa simpan hingga 91 hari tidak mempengaruhi kualitas dan kuantitas produk isolasi DNA leptospira dari spike urin.

Kesimpulan: Isolasi DNA menggunakan spin kolom kromatografi dengan resin sebagai matriks pemisahan memiliki kualitas dan kuantitas terbaik berdasarkan kemurnian dan konsentrasi DNA serta jumlah *Leptospira* spesifik gen *SecY* yang tinggi. Ekstraksi DNA dengan silika berbasis spin kolom menunjukkan stabilitas DNA, prosedur isolasi yang lebih cepat dan volume spesimen terkecil. Temperatur penyimpanan pada 4°C , -20°C , dan -80°C dan masa pakai 91 hari tidak berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas pada produk isolasi DNA leptospira dari spike urin.

Kata kunci: DNA isolation - Spike urine – leptospira diagnosis – leptospira DNA