

# Analisis Kuantitatif dan Kualitatif Asam Nukleat Menggunakan Quickdrop Spectrophotometer

## Latar Belakang

Spektrofotometri merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi dan menganalisis kemurnian DNA dan RNA. Parameter dasar tersebut penting diketahui sebelum melakukan analisis lebih lanjut terhadap asam nukleat (DNA dan RNA) seperti PCR, qPCR, sekuensing, dan DNA mikroarray. Konsentrasi DNA ditentukan dengan mengukur absorbansi DNA pada  $\lambda 260$  nm yang dihubungkan dengan faktor pengencerannya.

Sedangkan kemurnian DNA ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi pada  $\lambda 260/280$  dan  $260/230$  nm untuk melihat apakah terdapat kontaminasi protein atau senyawa kimia.

Kedua parameter dasar tersebut dapat dengan mudah diukur menggunakan *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer (UV-Vis)*. Spektrofotometer ini memiliki port mikro volume 0.5 mm, cuvette dan LCD layar sentuh yang mudah digunakan (*friendly used*) dan memungkinkan pengguna untuk melakukan berbagai eksperimen pada satu sistem.

Dalam analisis ini ditampilkan kemampuan *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer (UV-Vis)* untuk menentukan konsentrasi dan kemurnian asam nukleat dengan tingkat akurasi dan konsistensi yang tinggi.

## Bahan dan Metode

Alat dan bahan yang digunakan adalah *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* (Molecular Devices cat. #QUICKDROP), *UltraPure™ Calf Thymus DNA Solution* (Thermo Fisher cat. #15633019), *RNA Control 250 ng/μl* (Thermo Fisher cat. #AM7155) dan *10 mm Far UV Quartz Cuvettes* (Starna Cells cat. #9-Q-10)

### Analisis sisa sample

Analisis sisa sample diukur dengan membandingkan konsistensi hasil pengukuran pada  $\lambda 260$  nm antara *sample* dan *ultra-pure water*. Sebelum digunakan, *port micro volume* selalu dibersihkan terlebih dahulu dengan kain bersih.

### Linearitas kurva standar

Serangkaian konsentrasi sample dibuat dengan melakukan pengenceran dimulai dari konsentrasi *double-stranded DNA* (dsDNA) 2500 ng/μl. *ultra-pure water* digunakan sebagai blanko.

Absorbansi setiap sample diukur mulai  $\lambda 230$ -320 nm dengan menggunakan program *DNA quantification* pada *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer*. Setiap pengukurannya sample dan blanko diulang 3x dan Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) secara otomatis diukur dengan persamaan= $(A_{260}-A_{320}) \times \text{faktor pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml}$ .

Setelah itu, data konsentrasi dari masing-masing pengenceran akan dianalisis menggunakan *SoftMax® Pro Software* dan the *SoftMax Pro Import Feature* sehingga dapat dilihat linieritas hasil pengukuran.

### Analisis Perbandingan perbedaan sample volume

Analisis dilakukan dengan menggunakan 3 perbedaan *volume sample* yaitu 0.5, 1.0 dan 2.0 μl. Pengukuran absorbansi setiap volume diulang sebanyak 5x.

### Validasi konsentrasi RNA

Tahapan ini menggunakan RNA standar 250 ng/μl (ThermoFisher) yang selanjutnya diukur konsentrasinya pada *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer*.

### Analisis kontaminasi sample

Sample DNA yang terkontaminasi di buat dengan menambahkan larutan fenol sehingga konsentrasi larutannya menjadi 50 μM. Sample tersebut selanjutnya diukur absorbansinya dengan program *wavescan* pada *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* dan hasilnya dibandingkan dengan DNA murni.

## Hasil Analisis

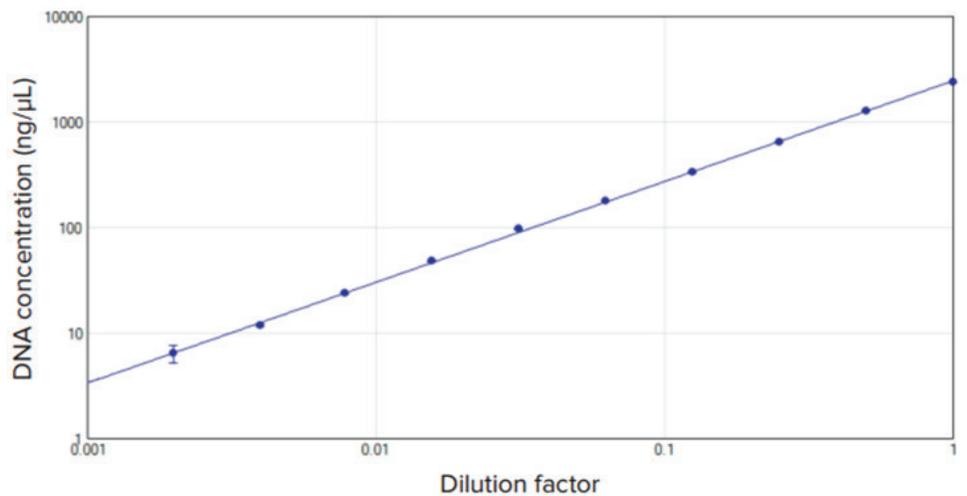
### Analisis sisa sample

Hasil analisis menunjukkan bahwa pembersihan port mikro volume dengan kain bersih sudah cukup untuk membersihkan sisa reagen sehingga hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi yang tidak jauh berbeda.

### Linearitas kurva standar

Korelasi antara konsentrasi DNA yang terukur dengan faktor mengencern menunjukkan linearitas yang sangat baik.

Berdasarkan kurva regresi tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi minimal yang dapat diukur oleh *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* adalah 1 ng/μL. konsentrasi yang dilaporkan oleh QuickDrop. Kurva menunjukkan linieritas yang sangat baik dengan nilai  $r^2$  dari 1.000.



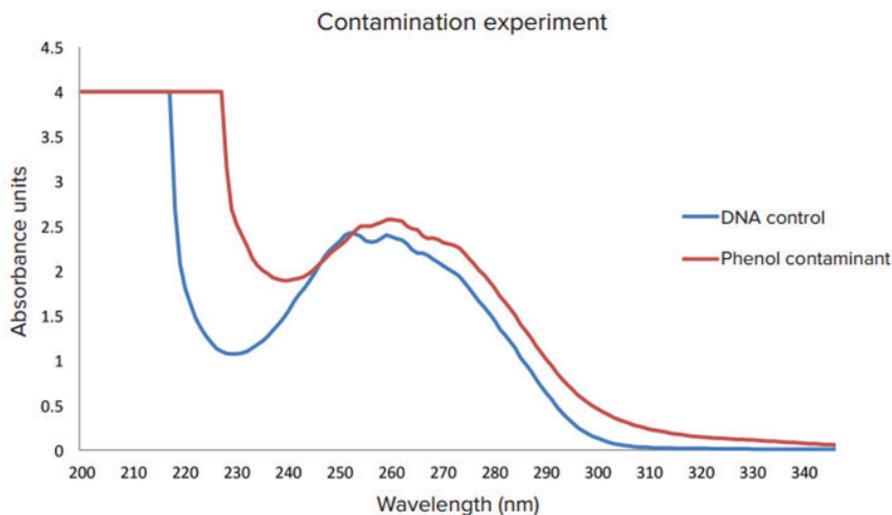
Gambar 1. Konsentrasi DNA yang dihitung vs. faktor pengenceran.

## Validasi konsentrasi RNA

Konsentrasi RNA standar yang terukur menggunakan *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* adalah 245.9 ng/μl. Hasil ini masih masuk ke dalam limit standar deviasi kontrol kit tersebut (250 ± 5 ng/μl).

## Analisis kontaminasi sample

Pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa absorbansi sample yang terkontaminasi berbeda dengan sample murni terutama pada λ230 nm. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan program *wavescan* pada *SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* telah berhasil mengidentifikasi keberadaan kontaminan. Dengan cara yang sama, kontaminasi lain seperti *guanidine thiocyanate* dapat juga di deteksi dengan alat ini. Untuk memudahkan analisis, alat ini dapat mengukur absorbansi pada rentang λ yang luas yaitu antara 190 sampai 1100 nm.



Gambar 2. Percobaan kontaminasi. Sampel yang terkontaminasi fenol dan kontrol yang tidak terkontaminasi diuji menggunakan fungsi *Wavescan*. Jejak pindaian gelombang dibuat grafiknya dan dilapisi menggunakan *Microsoft Excel*. Ada peningkatan absorbansi yang pasti pada tanda 230 nm.

## Kesimpulan

*SpectraMax® QuickDrop™ Spectrophotometer* merupakan *Spectrophotometer UV-Vis* yang dapat digunakan untuk menganalisis konsentrasi, kemurnian dan juga keberadaan kontaminan pada asam nukleat. Volume minimal yang dapat digunakan adalah 0.5 μl dengan rentang konsentrasi yang dapat diukur adalah 1-2500 ng/ μl.

## Reference:

<https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/br/nucleic-acid-quantitation-and-analysis-using-quickdrop-spectrophotometer>