

# PERBANDINGAN KUANTITAS DAN KUALITAS ISOLAT DNA *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN *FILTER BASED KIT*, *ALKALINE LYSIS* DAN *HEAT TREATMENT*

Hizb Hamzah Al Kahfi Barqly, Rio Risandiansyah\*, Noer Aini

\*Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** *Aspergillus niger* (*A. niger*) penyebab *Chronic Pulmonary Aspergillosis* (CPA) yang deteksinya dengan kultur membutuhkan waktu yang lama. Metode deteksi cepat dengan PCR memerlukan isolat DNA dengan kuantitas dan kualitas yang memadai dan umumnya diperoleh dengan *filter based kit* (FBK). Metode isolasi DNA yang sederhana, mudah dan murah perlu dikembangkan, namun analisa perbandingannya belum ada sehingga perlu dilakukan.

**Metode:** Penelitian eksperimental *in vitro* dengan *A. niger* yang dikuantifikasi dengan *haemocytometer*. Sampel jumlah selnya  $10^9$ ,  $10^4$  sel/ml dan kontrol normal saline (NS). Isolasi DNA dilakukan dengan metode *heat treatment* (HT), *alkaline lysis* (AL) dan FBK. Hasil isolat DNA dilakukan perhitungan kuantitas dan kualitas DNA dengan spektrofotometer nanodrop. Data dianalisis dengan *One Way ANOVA*, *LSD*, *Kruskal Wallis*, dan *Mann Whitney* ( $p < 0,05$ ).

**Hasil dan Pembahasan:** Pada  $10^9$  sel/ml, urutan perolehan kuantitas DNA dari terbaik ke terburuk ( $p < 0,05$ ) adalah HT>FBK>AL (194,8 – 10,6 µg/ml), sedangkan untuk kualitas  $A_{260/280}$  ( $p < 0,05$ ) adalah AL>FBK>HT dengan rentang (1,80 – 1,26), dan kualitas  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) adalah AL>HT>FBK (0,85 – 0,32). Pada jumlah sel  $10^4$  sel/ml, urutan kuantitas DNA ( $p < 0,05$ ) adalah HT>FBK>AL (12,8 – 0,2 µg/ml), sedangkan untuk kualitas  $A_{260/280}$  ( $p > 0,05$ ) adalah FBK=HT=AL (1,90 – 1,50), dan kualitas  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) adalah HT>FBK>AL (0,46 – 0,02). Pada NS, urutan perolehan kuantitas secara signifikan adalah HT>FBK=AL (4 – 0 µg/ml), dengan tidak ada perbedaan kualitas  $A_{260/280}$ , namun untuk kualitas  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) adalah HT>FBK=AL (0,59 – 0).

**Kesimpulan:** Kuantitas DNA terbaik pada konsentrasi  $10^9$  dan  $10^4$  sel/ml adalah metode HT, sedangkan kualitas DNA terbaik pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml adalah pada metode AL dan pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml adalah FBK.

**Kata Kunci:** *Aspergillus niger*; *Filter Based Kit*; *Alkaline Lysis*; *Heat Treatment*; *Kuantitas DNA*; *Kualitas DNA*.

\*Korespondensi:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

# QUANTITY AND QUALITY COMPARISON OF DNA ISOLAT *Aspergillus niger* USING *FILTER BASED KIT*, *ALKALINE LYSIS* AND *HEAT TREATMENT* METHODS

Hizb Hamzah Al Kahfi Barqly, Rio Risandiansyah\*, Noer Aini

\*Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

## ABSTRACT

**Introduction:** *Aspergillus niger* (*A. niger*) causes *Chronic Pulmonary Aspergillosis* (CPA), in which its detection using culture methods requires a long time; therefore, PCR can be used for rapid detection. A successful PCR requires DNA isolates with adequate quantity and quality, which is commonly obtained using *filter based kit* (FBK). A simple, easy and inexpensive DNA isolation method needs to be developed, but comparative analysis needs to be done.

**Methods:** This is an *in vitro* experimental study with *A. niger* quantified by *haemocytometer*. The sample cell count used was  $10^9$ ,  $10^4$  cells/ml and the control was normal saline (NS). DNA isolation was carried out using *heat treatment* (HT), *alkaline lysis* (AL) and FBK methods. DNA isolates were calculated for quantity and quality of DNA using a nanodrop spectrophotometer. Data was analyzed by *One Way ANOVA*, *LSD*, *Kruskal Wallis*, and *Mann Whitney* ( $p < 0.05$ ).

**Results and Discussion:** At  $10^9$  cells/ml, the order of DNA quantity from the best to worst ( $p < 0.05$ ) was HT>FBK>AL (194,8 – 10,6 µg/ml), while for quality  $A_{260/280}$  ( $p < 0,05$ ) was AL>FBK>HT with a range (1,80 – 1,26), and the quality  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) was AL>HT>FBK (0,85 – 0,32). In the number of cells  $10^4$  cells/ml, the order of DNA quantity ( $p < 0,05$ ) was HT>FBK>AL (12,8 – 0,2 µg/ml), while for quality  $A_{260/280}$  ( $p > 0,05$ ) is FBK=HT=AL (1,90 – 1,50), and the quality  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) is HT>FBK>AL (0,46 – 0,01). In NS, the order of significant quantity was HT>FBK=AL (4 – 0 µg/ml), with no difference in quality  $A_{260/280}$ , but for quality  $A_{260/230}$  ( $p < 0,05$ ) it was HT>FBK=AL (0,59 – 0).

**Conclusion:** At both concentrations, the highest DNA quantity obtained was using HT, however, the highest quality at  $10^9$  cells/ml was using AL, and  $10^4$  cells/ml was using FBK.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; *Filter Based Kit*; *Alkaline Lysis*; *Heat Treatment*; *DNA Quantity*; *DNA Quality*.

\*Correspondence author:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail: [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

## PENDAHULUAN

Aspergillosis merupakan penyebab *chronic pulmonary disease* yang biasa dikenali *chronic pulmonary aspergillosis* (CPA) yang sering menemani pasien dengan TB dan HIV.<sup>1,2</sup> Penyebab aspergillosis adalah *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, dan *A. niger*.<sup>3</sup> Data epidemiologi global menunjukkan sekitar 3 juta orang menderita CPA.<sup>4</sup> Angka kematian pasien CPA adalah 50-85 % selama 5 tahun, terutama pasien CPA dengan penyakit penyerta TB.<sup>5</sup> Belum ada data pasti jumlah CPA di Indonesia, namun diestimasi berdasarkan perhitungan dan eksplorasi dari WHO di Indonesia, dari 274.397 pasien TB sebanyak 83.000 pasien menjadi CPA dalam 5 tahun.<sup>6</sup> Sehingga upaya untuk menegakkan diagnosis aspergillosis perlu dilakukan.

Dalam menegakkan diagnosis aspergillosis perlu diketahui jenis *Aspergillus* sp. yang menginfeksi. *Gold standard* untuk pemeriksaan tersebut adalah dengan menggunakan pemeriksaan kultur dan histopatologis, namun kedua pemeriksaan tersebut tidak dapat menunjukkan genus dan spesies jamur dan memerlukan waktu yang lama. Hal ini menyebabkan penundaan diagnosis karena sensitivitas dan spesifisitas yang terbatas.<sup>7-10</sup> Metode PCR dapat digunakan untuk mengetahui jenis *Aspergillus* sp. dengan cepat, namun metode ini membutuhkan isolat DNA dengan kuantitas dan kualitas DNA yang baik.<sup>3</sup>

PCR selama ini pada jamur menggunakan isolat DNA dari metode *filter based kit* (FBK) atau kit komersial,<sup>11</sup> namun metode isolasi DNA ini memerlukan tambahan beberapa peralatan, dan bahan yang khusus yang tidak mudah diperoleh, dan memiliki harga yang mahal, sehingga sulit digunakan pada negara berkembang.<sup>12-14</sup> Sehingga dibutuhkan metode isolasi DNA yang lebih sederhana yaitu metode *alkaline lysis* (AL) dan *heat treatment* (HT) yang memiliki keunggulan dengan proses yang cepat dan sederhana, biaya yang murah dan relatif mudah.<sup>12,15</sup>

Penelitian mengenai kuantitas dan kualitas DNA *Aspergillus niger* (*A. niger*) yang diperoleh dengan metode *alkaline lysis*, *heat treatment* dan *filter based kit* belum dilakukan. Penelitian ini melakukan perbandingan kuantitas dan kualitas DNA *A. niger* dengan metode sederhana *alkaline lysis* dan *heat treatment* dibandingkan dengan metode *filter based kit*.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian *in vitro* eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA) pada bulan Juni - Juli 2021.

### Sampel Penelitian

Sampel isolasi DNA jamur pada penelitian ini adalah *A. niger* yang diperoleh dari dan dideterminasi oleh Fakultas Kedokteran Universitas

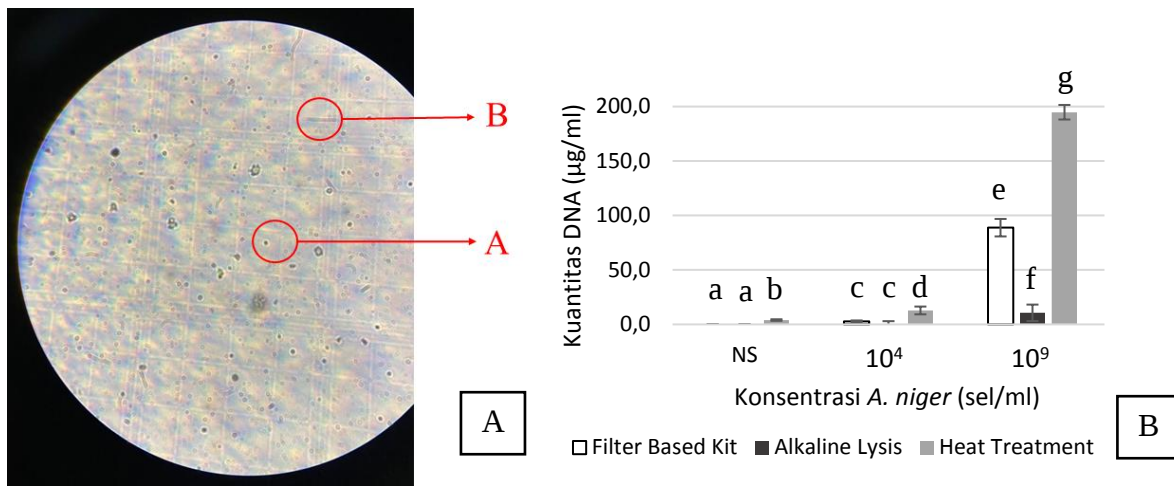
Muhammadiyah Malang (UMM). Untuk peremajaan dilakukan inokulasi pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) steril dan diinkubasi selama 3-5 hari pada suhu 37°C dan setelahnya dilakukan inokulasi pada media cair *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB).<sup>16,17</sup> Setelah itu dikuantifikasi menggunakan *hemocytometer* dengan cara menghitung sel (spora dan hifa) yang terletak sebelah kanan dan atas kotak kecil *hemocytometer*. Perhitungan menggunakan rumus: Jumlah sel (sel/ml) = Rata-rata 16 kotak x 0,02 mm x 0,02 mm x 0,1 mm x faktor pengenceran.<sup>18</sup>

### Isolasi DNA *A. niger* Metode *Filter Based Kit*

Isolasi DNA dengan metode *filter based kit* Wizard® SV Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, 2012). Tabung reaksi berisi konsentrasi *A. niger* diambil sebanyak 1,5 ml dan dimasukkan pada *microtube*. Pelisisan dinding sel dilakukan dengan ditambahkan Wizard® SV lysis buffer sebanyak 150 µl dilakukan dengan cara pemipetan, setelah itu dipindahkan ke dalam *minicolumn* Wizard® SV dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 xg selama 3 menit. Pada proses purifikasi DNA ditambahkan 650 µl *Column Wash Solution* (CWA; dengan penambahan 95% etanol) dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 xg selama 1 menit, setelah itu cairan dibuang dari *collection tube* (proses ini dilakukan 4 kali pencucian). Proses presipitasi DNA dilakukan dengan sentrifugasi selama 2 menit pada 13.000 xg untuk mengeringkan *binding matrix*. Untuk rehidrasi Wizard® SV *minicolumn* dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru, lalu ditambahkan *Nuclease-Free Water* sebanyak 50 µl, diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 xg selama 1 menit.<sup>19</sup>

### Isolasi DNA *A. niger* Metode *Alkaline Lysis*

Isolasi DNA dengan metode *alkaline lysis* berdasarkan Sambrook dan Russell (2001), Tabung reaksi berisi konsentrasi *A. niger* diambil sebanyak 1,5 ml dimasukkan pada *microtube* disentrifugasi pada 17.698 xg selama 1 menit dan supernatan dibuang, ulangi langkah tersebut hingga pelet jamur menjadi kering. Proses pelisisan dinding sel mengandung NaOH ditambahkan sebanyak 200 µL ke dalam suspensi jamur, dicampurkan isinya dengan cara membalik tabung 4-6 kali. Proses presipitasi DNA dengan ditambahkan *potassium acetate* sebanyak 300 µL dan campur isinya dengan membalik tabung 4-6 kali. Setelah itu suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 17.698 xg selama 5 menit. Presipitasi DNA dilakukan dengan ditambahkan isopropanol sebanyak 300 µL dan dicampur dengan cara membalik tabung beberapa kali dan diinkubasi dalam -20 °C selama 30 menit. Presipitasi juga dengan EtOH 70% sebanyak 600 µL dan disentrifugasi pada 17.698 xg selama 5 menit. Rehidrasi menggunakan buffer TE sebanyak 20-50 µL.<sup>20</sup>



**Gambar 1.a. Hasil Kuantifikasi DNA *A. niger*, b. Hasil Kuantitas DNA dengan Metode Isolasi DNA.**

**Keterangan:** A. Struktur sel *A. niger*: 1) Spora, 2) Hifa; B. Hasil kuantitas DNA dengan metode isolasi DNA: Data kuantitas DNA dinyatakan dalam  $\text{mean} \pm \text{SD}$  dalam  $n = 5$ . Kuantitas DNA metode FBK dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$  µg/ml),  $10^4$  sel/ml ( $2,8 \pm 0,83$  µg/ml) dan  $10^9$  sel/ml ( $88,8 \pm 8,04$  µg/ml). Kuantitas DNA metode AL dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$  µg/ml),  $10^4$  sel/ml ( $0,2 \pm 2,77$  µg/ml) dan  $10^9$  sel/ml ( $10,6 \pm 7,56$  µg/ml). Kuantitas DNA metode HT dengan kontrol NS ( $4 \pm 0,70$  µg/ml),  $10^4$  sel/ml ( $12,8 \pm 3,56$  µg/ml) dan  $10^9$  sel/ml ( $194,8 \pm 6,68$  µg/ml). Data diuji dengan *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ). Pada notasi huruf (a dan b), (c dan d) dan (e, f dan g) jika berbeda menandakan kuantitas DNA berbeda signifikan.

#### Isolasi DNA *A. niger* Metode Heat Treatment

Isolasi DNA *heat treatment* (Omar et al., 2014), Tabung reaksi berisi konsentrasi *A. niger* diambil sebanyak 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan  $15.000 \times g$  selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Prinsipnya hanya melalui proses pelisisan dinding sel dengan cara dididihkan pada suhu  $95-100^\circ \text{C}$  dalam penangas air selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan  $15.000 \times g$  selama 10 detik. Direhidrasi dengan *Nuclease-Free Water* sebanyak 50 µl dan disentrifugasi  $13.000 \times g$  selama 1 menit.<sup>21</sup>

#### Pengukuran Kuantitas dan Kualitas DNA

Isolat DNA dari masing-masing metode diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop. Hasil kuantitas DNA dilihat pada bagian *concentration* pada spektrofotometer nanodrop, kuantitas DNA yang baik jika lebih dari 10 µg/ml.<sup>22,23</sup> Hasil kualitas DNA dilihat pada rasio  $A_{260/280}$  dan  $A_{260/230}$  pada spektrofotometer nanodrop, kualitas DNA rasio  $A_{260/280}$  dikategorikan baik apabila sebesar 1,8-2,0 dan kualitas DNA rasio  $A_{260/230}$  dikategorikan baik sebesar 2,0-2,2.<sup>24,25</sup>

#### Analisis Data

Data diuji normalitas dan homogenitasnya. apabila data memenuhi syarat maka dilakukan uji *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA) dan uji lanjut dengan *post hoc* menggunakan *Least Significant Difference* (LSD). Apabila data tidak memenuhi syarat maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann Whitney*. Data dinyatakan signifikan jika  $p < 0,05$ .

## HASIL PENELITIAN

### Hasil Kuantifikasi *A. niger*

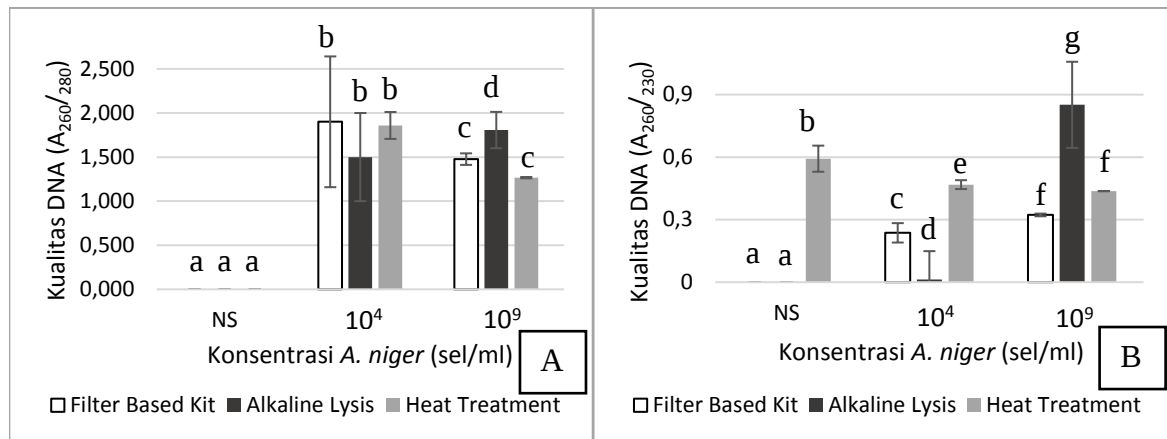
Hasil kuantifikasi *A. niger* menggunakan *haemocytometer* dapat dilihat pada gambar 1.A. Karakteristik *A. niger* secara mikroskopis dapat terlihat adanya struktur spora atau konidia berduri berwarna coklat kehitaman dan struktur hifa yang bersepta.<sup>26</sup>

### Perbandingan Kuantitas, Kualitas ( $A_{260}/A_{280}$ ) dan Kualitas ( $A_{260}/A_{230}$ ) DNA dari Metode Filter Based Kit, Alkaline Lysis dan Heat Treatment pada Beberapa Konsentrasi.

Hasil kuantitas dan kualitas ( $A_{260}/A_{280}$  dan  $A_{260}/A_{230}$ ) isolasi DNA dengan menggunakan metode *filter based kit*, *heat treatment* dan *alkaline lysis* pada *A. niger* dengan konsentrasi  $10^9$ ,  $10^4$  sel/ml dan kontrol normal saline dapat dilihat pada gambar 1.B, 2.A dan 2.B.

Pada gambar 1.B hasil kuantitas DNA dengan normal saline dan konsentrasi  $10^4$  sel/ml metode *heat treatment* berbeda signifikan dibandingkan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*. hasil kuantitas DNA dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml pada setiap metode berbeda signifikan.

Pada gambar 2.A hasil kualitas DNA  $A_{260}/A_{280}$  dengan normal saline dan konsentrasi  $10^4$  sel/ml pada setiap metode tidak berbeda signifikan. Kualitas DNA  $A_{260}/A_{280}$  dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml metode *alkaline lysis* berbeda signifikan dibandingkan metode *heat treatment* dan *filter based kit*.



**Gambar 2.a Hasil Kualitas DNA dengan Metode Isolasi DNA dengan absorbansi 260/280, b. Pada Absorbansi 260/230**

**Keterangan:** A. Data kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) dinyatakan dalam  $mean \pm SD$  dalam  $n = 5$ . Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) metode FBK dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$ ),  $10^4$  sel/ml ( $1,90 \pm 0,74$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $1,47 \pm 0,06$ ). Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) metode AL dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$ ),  $10^4$  sel/ml ( $1,50 \pm 0,50$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $1,80 \pm 0,20$ ). Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) metode HT dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$ ),  $10^4$  sel/ml ( $1,85 \pm 0,15$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $1,26 \pm 0,00$ ). Data pada  $10^4$  sel/ml diuji dengan *One Way ANOVA* ( $p > 0,05$ ) dan pada  $10^9$  sel/ml diuji dengan *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ). Pada notasi huruf (a), (b) dan (c dan d) jika berbeda menandakan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) berbeda signifikan; B. Data kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) dinyatakan dalam  $mean \pm SD$  dalam  $n = 5$ . Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode FBK dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$ ),  $10^4$  sel/ml ( $0,23 \pm 0,04$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $0,32 \pm 0,00$ ). Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode AL dengan kontrol NS ( $0 \pm 0$ ),  $10^4$  sel/ml ( $0,01 \pm 0,13$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $0,85 \pm 0,20$ ). Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode HT dengan kontrol NS ( $0,59 \pm 0,06$ ),  $10^4$  sel/ml ( $0,46 \pm 0,02$ ) dan  $10^9$  sel/ml ( $0,43 \pm 0,00$ ). Data diuji dengan *Kruskal Wallis* ( $p < 0,05$ ). Pada notasi huruf (a dan b), (c, d dan e) dan (f dan g) jika berbeda menandakan kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) berbeda signifikan.

Pada **gambar 2.B** hasil kualitas DNA  $A_{260/230}$  dengan normal saline metode *heat treatment* berbeda signifikan dibandingkan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*. Hasil kualitas DNA  $A_{260/230}$  dengan konsentrasi  $10^4$  sel/ml pada setiap metode berbeda signifikan. Kualitas DNA  $A_{260/230}$  dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml metode *alkaline lysis* berbeda signifikan dibandingkan metode *filter based kit* dan *heat treatment*.

## PEMBAHASAN

### Perbandingan Metode Isolasi DNA Pada Hasil Kuantitas DNA

Dari hasil penelitian didapatkan kuantitas DNA pada semua konsentrasi metode *heat treatment* lebih tinggi dibandingkan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA, yaitu jumlah sel yang digunakan pada setiap metode isolasi DNA, proses pelisisan dinding sel yang tidak sempurna, adanya perlakuan fisik yang berlebihan seperti yang dapat terjadi dalam proses *pipetting*, pada saat mencampurkan larutan di *microtube*, proses setrifugasi, dan *vortex* sehingga komponen DNA rusak dan menghasilkan kuantitas DNA yang rendah.<sup>27-29</sup>

Berhasil atau tidaknya metode isolasi DNA dapat dilihat dari kuantitas isolat DNA. Penentuan kuantitas DNA yang baik dapat didefinisikan sebagai jumlah yang diperlukan untuk keberhasilan dalam proses-proses selanjutnya yang menggunakan DNA, seperti PCR, sequencing DNA, maupun elektroforesis.<sup>30</sup> Konsentrasi DNA yang diperlukan PCR sekitar 10-20  $\mu\text{g/ml}$ , sementara untuk DNA

*sequencing* membutuhkan konsentrasi DNA sekitar 10-50  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>22,23</sup> Berdasarkan batas minimum kuantitas DNA dapat dikatakan baik ataupun dapat memenuhi proses selanjutnya seperti PCR ataupun sequencing DNA pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml semua metode memenuhi kriteria tersebut, namun pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml hanya metode *heat treatment*.

Seluruh spesies patogen memiliki variasi yang berbeda dalam jumlah sel yang dibutuhkan untuk berhasil menginfeksi inang. Jumlah ini dikenal sebagai *infective dose*. Saat ini belum diketahui secara jelas mengapa *infective dose* bervariasi, pada perbedaan antara patogen.<sup>31</sup> Jamur *Aspergillus* dapat menginfeksi membutuhkan sekitar  $10^4$  CFU/ml (*low dose*) dan  $10^8$  CFU/ml (*high dose*).<sup>32</sup>

Menurut referensi manual yang dipublikasi oleh kit wizard konsentrasi sampel yang memadai untuk mendapatkan DNA yang baik adalah  $5 \times 10^6$  sel.<sup>19</sup> Jumlah sel yang biasanya diperlukan untuk mendapatkan DNA yang baik lebih dari  $5 \times 10^5$  sel.<sup>33</sup> Berdasarkan batas minimum jumlah sel untuk mendapatkan kuantitas DNA yang baik pada penelitian ini dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml semua metode isolasi DNA penelitian ini mendapatkan kuantitas DNA yang baik.

Metode *heat treatment* adalah metode isolasi yang sederhana, metode ini hanya melalui tahap pelisisan dinding sel dengan cara pemaparan pada suhu yang tinggi 100 °C selama 10 menit dapat melisis dinding sel dan membran sel. Metode ini tidak membutuhkan buffer atau menggunakan instrumen yang khusus, sehingga memerlukan biaya yang lebih sedikit dari pada metode *filter based kit*.<sup>34-36</sup>

Hasil kuantitas DNA metode *heat treatment* dengan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (12,8  $\mu\text{g/ml}$ ) dan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (194,8  $\mu\text{g/ml}$ ) termasuk kuantitas DNA yang baik. Kuantitas DNA yang baik didapatkan dari metode *heat treatment* dikarenakan dinding sel jamur dapat dilisis dengan sempurna pada pemanasan pada suhu yang tinggi, sehingga diharapkan untuk dinding sel lisis dan didapatkan kuantitas DNA yang tinggi.<sup>34,35,37,38</sup>

Metode *alkaline lysis* merupakan metode isolasi DNA yang umum digunakan, karena menggunakan reagen kimia dalam prosesnya sehingga metode ini sederhana, murah dan mudah digunakan dibandingkan metode *filter based kit*.<sup>39</sup> Pada prinsipnya metode ini melalui proses pelisisan dinding sel dengan Natrium Hidroksida (NaOH) dan presipitasi DNA dengan menggunakan etanol, namun tidak melalui tahap purifikasi DNA.<sup>40</sup>

Hasil kuantitas DNA metode *alkaline lysis* dengan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) termasuk dalam kuantitas DNA yang rendah, namun pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml (10,6  $\mu\text{g/ml}$ ) menghasilkan kuantitas DNA yang baik. Diduga faktor yang paling berpengaruh terhadap rendahnya kuantitas DNA yang didapat adalah pada proses pelisisan DNA dengan larutan alkali yang mengandung NaOH dengan konsentrasi 0,2 N tidak dapat melisis dinding sel jamur sehingga kuantitas DNA yang didapatkan rendah.<sup>41-43</sup> Pada penelitian Zhu dan Wu tahun 2019 penelitian yang dilakukan pada sampel jamur, *yeast*, tanaman, dan alga yang mengandung dinding sel  $\beta$ -glucan dapat dilisis dengan NaOH pada konsentrasi 2 N memiliki hasil *yield* DNA paling tinggi.<sup>44</sup> Selain itu jumlah sel jamur yang rendah dapat menyebabkan rendahnya kuantitas DNA.<sup>43,45</sup>

Metode *alkaline lysis* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml termasuk metode memiliki kuantitas yang rendah dibandingkan metode *filter based kit* dan *heat treatment*, namun metode ini pada jumlah sel tersebut masih termasuk memiliki kuantitas dan kualitas DNA yang baik dan dapat dilakukan ke proses yang selanjutnya.

Metode *filter based kit* merupakan suatu metode isolasi DNA berbasis kit komersial yang menggunakan *spin column* yang mengandung filter, hal ini yang menyebabkan metode ini memerlukan biaya yang mahal, namun metode ini dapat menghasilkan DNA dengan kualitas yang tinggi. Metode ini melalui proses pelisisan dinding sel, purifikasi DNA dan presipitasi DNA yang dapat mendapatkan hasil DNA yang berkualitas tinggi dengan cepat.<sup>13,14</sup>

Hasil kuantitas DNA metode *filter based kit* dengan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (2,8  $\mu\text{g/ml}$ ) termasuk rendah, namun pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml (88,8  $\mu\text{g/ml}$ ) menghasilkan kuantitas DNA yang baik. Kuantitas DNA metode *filter based kit* yang rendah karena disebabkan oleh jumlah konsentrasi sel yang rendah.<sup>46</sup> Selain itu metode yang digunakan pada penelitian ini tidak mengandung enzim proteinase K

pada saat proses pelisisan yang akan mempengaruhi hasil kualitasnya, Proteinase K berfungsi untuk mendegradasi suatu protein yang dapat menyebabkan kerusakan atau degradasi DNA yang disebut dengan DNase.<sup>27,47</sup> sehingga aktifitas dari enzim tersebut dapat menurunkan jumlah kuantitas DNA.

### Perbandingan Metode Isolasi DNA Terhadap Hasil Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ dan $A_{260/230}$ )

Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml metode *alkaline lysis* lebih baik dibandingkan metode *filter based kit* dan *heat treatment*. Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml metode *filter based kit* lebih baik dibandingkan metode *alkaline lysis* dan *heat treatment*, namun metode *heat treatment* masih dapat dikatakan memiliki kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang baik. Pada kontrol normal saline setiap metode memiliki kualitas DNA yang sama.

Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml metode *alkaline lysis* lebih baik dibandingkan metode *filter based kit* dan *heat treatment*. Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml metode *filter based kit* lebih baik dibandingkan metode *alkaline lysis* dan *heat treatment*. Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) pada kontrol normal saline metode *heat treatment* lebih tinggi dibandingkan *alkaline lysis* dan *filter based kit*.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kualitas DNA yaitu proses purifikasi dan presipitasi DNA tidak maksimal, sehingga dapat menyebabkan DNA terkontaminasi dari RNA, protein dan bahan organik.<sup>27,28</sup> Berhasil atau tidaknya metode isolasi DNA dapat dilihat dari kualitas isolat DNA ( $A_{260/230}$ ) dan ( $A_{260/280}$ ). Kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) dan ( $A_{260/280}$ ) yang baik dapat diartikan sebagai kemurnian DNA yang diperlukan untuk keberhasilan dalam proses-proses selanjutnya seperti PCR dan DNA sequencing. Kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang diperlukan pada proses-proses tersebut adalah hasil rasio  $A_{260/280}$  1,8-2,0. Sedangkan kualitas DNA  $A_{260/230}$  dengan rasio 2,0-2,2.<sup>24,25</sup>

Berdasarkan rentang kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) dapat dikatakan baik ataupun dapat memenuhi proses selanjutnya seperti PCR pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml hanya metode *alkaline lysis* memenuhi kriteria tersebut, namun pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml metode *filter based kit* dan *heat treatment*. Sedangkan kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) pada semua konsentrasi setiap metode tidak mendapat kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) yang baik.

Hasil kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) jika kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminan berupa protein,<sup>24,25</sup> kualitas isolasi DNA ( $A_{260/230}$ ) kurang dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi dari garam dan bahan organik yang berasal dari dinding sel jamur, seperti  $\alpha$ -glucan,  $\beta$ -glucan, galactomannan, dan chitin.<sup>24,48</sup>

Metode *heat treatment* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (1,26) menunjukkan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang kurang baik, namun pada konsentrasi sel sebesar  $10^4$  sel/ml (1,85) menghasilkan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang baik. Hasil kualitas DNA ( $A_{260/230}$ )

metode *heat treatment* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (0,43) dan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (0,46) termasuk kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) yang rendah.

Kualitas DNA ( $A_{260/280}$  dan  $A_{260/230}$ ) yang rendah pada metode *heat treatment* menandakan adanya kontaminan, karena metode ini hanya melalui tahap pelisisan dinding sel saja dan tidak melalui tahap presipitasi dan purifikasi DNA, sehingga tingkat kontaminasi dari protein dan bahan organik cukup tinggi.<sup>34,35,46</sup>

Metode *alkaline lysis* dengan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (1,50) menunjukkan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang kurang baik, namun pada konsentrasi  $10^9$  sel/ml (1,80) menghasilkan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang baik. Hasil kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode *alkaline lysis* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (0,85) dan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (0,01) termasuk kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) yang rendah.

Kualitas DNA ( $A_{260/280}$  dan  $A_{260/230}$ ) yang rendah pada metode *alkaline lysis* menandakan adanya kontaminan, diduga karena larutan alkali yang mengandung NaOH tidak dapat menghancurkan kontaminan protein, karbohidrat dan bahan organik sehingga kualitas DNA yang didapatkan rendah,<sup>41-43</sup> Selain hal itu pada metode ini tidak melalui tahap purifikasi DNA, sehingga DNA tidak dapat terpisahkan dari kontaminan.<sup>40,45</sup>

Kualitas DNA metode *filter based kit* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (1,47) termasuk kuantitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang kurang baik, namun pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml (1,9) menghasilkan kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) yang baik. Hasil kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode *alkaline lysis* dengan konsentrasi  $10^9$  sel/ml (0,32) dan konsentrasi  $10^4$  sel/ml (0,23) termasuk kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) yang rendah.

Kualitas DNA ( $A_{260/280}$  dan  $A_{260/230}$ ) yang rendah pada metode *filter based kit* menandakan adanya kontaminan. Hal ini juga disebabkan oleh karena tidak adanya enzim proteinase K untuk mendegradasi kontaminan protein maupun bahan organik yang ada pada jamur, sehingga jumlah protein dan karbohidrat kontaminan meningkat dan kualitas DNA yang didapatkan rendah.<sup>27,47</sup> Selain itu rendahnya kualitas disebabkan dari kontaminan tidak terbuang atau tersaring secara menyeluruh saat proses purifikasi DNA.<sup>49</sup>

Hasil kuantitas DNA dengan normal saline metode *alkaline lysis* dan *filter based kit* tidak menghasilkan kuantitas, namun pada metode *heat treatment* menghasilkan kuantitas DNA. Hasil kualitas DNA ( $A_{260/280}$ ) dengan normal saline semua metode tidak menghasilkan kemurnian, namun hasil kualitas DNA ( $A_{260/230}$ ) metode *heat treatment* menghasilkan kemurnian. Hal ini diduga adanya *human error* ataupun *noise* penelitian, yaitu adanya penumpukan sisa sampel dan penumpukan residu karena sebelum spektrofotometer nanodrop digunakan pada normal saline telah digunakan dahulu pada konsentrasi jamur  $10^9$  sel/ml, sehingga dapat menyebabkan residu. Selain hal itu diduga juga adanya normal saline yang terkontaminasi atau

larutan normal saline kotor dapat mempengaruhi pembacaan spektrofotometer nanodrop.<sup>50,51</sup>

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, analisis data serta pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Kuantitas isolat DNA *A. niger* pada konsentrasi  $10^9$  dan  $10^4$  sel/ml metode *heat treatment* lebih baik dibandingkan *filter based kit* dan *alkaline lysis*.
2. Kualitas ( $A_{260/280}$ ) isolat DNA *A. niger* pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml didapatkan hasil paling baik dengan metode *filter based kit*, sedangkan pada  $10^9$  sel/ml hasil paling baik pada metode *alkaline lysis*.
3. Kualitas ( $A_{260/230}$ ) isolat DNA *A. niger* pada konsentrasi  $10^4$  dan  $10^9$  sel/ml pada ketiga metode tidak memenuhi kriteria kualitas ( $A_{260/230}$ ) baik.

## SARAN

Penelitian ini menyarankan beberapa hal berikut ini untuk penelitian selanjutnya sebagai bentuk pengembangan dan kemajuan suatu ilmu pengetahuan:

1. Untuk membuktikan secara aplikatif kuantitas dan kualitas dari isolasi DNA, penelitian ini dapat dilanjutkan ke uji-uji selanjutnya seperti elektroforesis, PCR, RT-PCR atau DNA sequencing.
2. Melakukan perbandingan kuantitas dan kualitas isolat DNA pada kurang dari konsentrasi  $10^4$  sel/ml dan lebih dari  $10^9$  sel/ml.
3. Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan modifikasi metode sederhana dengan tahapan proses isolasi DNA yang lengkap dengan cara menggabungkan beberapa tahap *alkaline lysis* dan *heat treatment* untuk mendapatkan kuantitas dan kualitas DNA yang lebih baik.
4. Pada penelitian selanjutnya metode *alkaline lysis* pada larutan alkali mengandung NaOH dapat melakukan eksplorasi peningkatan konsentrasi NaOH.
5. Melihat hasil isolat DNA pada jamur jenis yang lain.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada IOM FK UNISMA, tim kelompok penelitian yang telah membantu penelitian ini dan dr. Rahma Triliana, M.Kes, PhD sebagai *peer reviewer*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rozaliyani, A., Rosianawati, H., Handayani, D., Agustin, H., Zaini, J., Syam, R., Adawiyah, R., Tugiran, M., Setianingrum, F., Burhan, E., Kosmidis, C., dan Wahyuningsih, R. Chronic Pulmonary Aspergillosis in Post Tuberculosis Patients in Indonesia and the Role of LDBio Aspergillus ICT as Part of the Diagnosis

- Scheme. **J Fungi**. 2020;6(4):1–10.
2. Setianingrum, F., Rozaliyani, A., Syam, R., Adawiyah, R., Tugiran, M., Sari, C. Y. I., Burhan, E., Wahyuningsih, R., Rautemaa-Richardson, R., dan Denning D.W. Evaluation and comparison of automated and manual ELISA for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) in Indonesia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2020;98(3).
  3. Wilopo, B. A., Richardson, M. D., dan Denning, D. W. Diagnostic Aspects of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Present and New Directions. Vol. 13, **Current Fungal Infection Reports**. 2019. p. 292-300.
  4. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., dan White, T. C. Hidden killers: human fungal infections. Vol. 4, **Science translational medicine**. 2012.
  5. Lowes, D., Al-Shair, K., Newton, P. J., Morris, J., Harris, C., Rautemaa-Richardson, R., dan Denning, D. W. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. **European Respiratory Journal**. 2017;49(2).
  6. Wahyuningsih, R., Adawiyah, R., Rozaliyani, A., Denning, D. W., Prihartono, J., Syam, R., Wulandari, E. A. T., Imran, D., Mulyati, Siagian, F. E., dan Denning, D. W. Re-Estimation of the serious mycoses burden in Indonesia. *Proc 27th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;1454.
  7. Yu Q, He J, Xing B, Li X, Qian H, Zhang H, Xu M, dan Peng H. Potential value of serum *Aspergillus* IgG antibody detection in the diagnosis of invasive and chronic pulmonary aspergillosis in non-agranulocytic patients. **BMC pulmonary medicine**. 2020;20(1).
  8. Van Burik, J. A., Myerson, D., Schreckhise, R. W., & Bowden, R. A. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 1998;36(5):1169–75.
  9. Guarner, J., dan Brandt, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Vol. 24, **Clinical Microbiology Reviews**. 2011. p. 247–80.
  10. Arvanitis, M., Anagnostou, T., Fuchs, B. B., Caliendo, A. M., dan Mylonakis, E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**. 2014;27(3):490–526.
  11. Tan, S. C., dan Yiap, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Vol. 2009, **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2009.
  12. Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. D. T., dan Krieger, M. A. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. Vol. 2017, **BioMed research international**. 2017.
  13. Shi, R., Lewis, R. S., dan Panthee, D. R. Filter paper-based spin column for low throughput nucleic acid purification. **bioRxiv**. 2018.
  14. Shi, R., Lewis, R. S., dan Panthee, D. R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. **Plos one**. 2018;13(12).
  15. Dilhari, A., Sampath, A., Gunasekara, C., Fernando, N., Weerasekara, D., Sissons, C., McBain, A., dan Weerasekera, M. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. **Amb Express**. 2017;7(1).
  16. Gandhi, B., Summerbell, R., dan Mazzulli, T. Evaluation of the Copan ESwab transport system for viability of pathogenic fungi by use of a modification of Clinical and Laboratory Standards Institute document M40-A2. **Journal of clinical microbiology**. 2018;56(2).
  17. PHE. UK Standards for Microbiology Investigations Inoculation of culture media for bacteriology. Qual Guid [Internet]. 2017;(2):1–22. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/583859/Q\\_5i2.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/583859/Q_5i2.pdf)
  18. Alqaisi M. Hemocytometer Calculator. **Hortic Agric J**. 2018;12(4):1–2.
  19. Promega C. Isolation of Genomic DNA from Tissue Culture Cells Using a Microcentrifuge. 2012.
  20. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3. Hum Mutat. 2001;18:Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  21. Ahmed, O. B., Asghar, A. H., dan Elhassan, M. M. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. **African Journal of Microbiology Research**. 2014;8(6):598–602.
  22. Genepool. Illumina Sequencing Sample Submission. 2009; Available from: <http://genepool.bio.ed.ac.uk/illumina/samples.html>
  23. Base Asia. DNA Sequencing Service Quick Guide. 2013;16102019. Available from: [http://www.base-asia.com/downloads/products/dna\\_sequencing/DNA\\_Seq\\_Quick\\_Guide-v5\\_BASEM-091113.pdf](http://www.base-asia.com/downloads/products/dna_sequencing/DNA_Seq_Quick_Guide-v5_BASEM-091113.pdf)
  24. Matlock, B. Assessment of nucleic acid purity. Technical Note. 2015. p. 1–2.
  25. Boesenberg-Smith, K. A., Pessarakli, M. M., dan Wolk, D. M. Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. **Clinical Microbiology Newsletter**. 2012;34(1):1–6.
  26. Gautam, A. K., dan Bhadauria, R. Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala

- powder. **African J Biotechnol.** 2012;11(104):16814–23.
27. Promega C. Wizard® SV Genomic DNA Purification System. Components [Internet]. 2010;1123–6. Available from: papers2://publication/uuid/96B2F682-0A28-4CDC-83AA-E7B8B5B58DAD
  28. Merck. Genomic DNA Preparation Troubleshooting. 2021; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/problems-during-genomic-dna-preparation>
  29. Nurasyiah S, Romlah S, Naully PG. Perbandingan Efektivitas Metode Isolasi Dna (Boilling Water dan CTAB) Pada Bakteri *Klebsiella pneumoniae*. **Pros Pertem Ilm Nas Penelit Pengabd Masy (PINLITAMAS 1) Dies Natalis ke-16.** 2018;1(1):627–34.
  30. Sirkov IN. Nucleic Acid Isolation and Downstream Applications. In: **Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools.** 2016.
  31. Leggett, H. C., Cornwallis, C. K., dan West, S. A. Mechanisms of pathogenesis, infective dose and virulence in human parasites. **PLoS pathogens.** 2012;8(2).
  32. Skriba, A., Pluhacek, T., Palyzova, A., Novy, Z., Lemr, K., Hajduch, M., Petrik, M., dan Havlicek, V. Early and non-invasive diagnosis of aspergillosis revealed by infection kinetics monitored in a rat model. **Frontiers in microbiology.** 2018;9(OCT).
  33. van der Burg, M., Kreyenberg, H., Willasch, A., Barendregt, B. H., Preuner, S., Watzinger, F., Lion, T., Roosnek, E., Harvey, J., Alcoceba, M., Diaz, M. G., Bader, P., dan Van Dongen, J. J. M. Standardization of DNA isolation from low cell numbers for chimerism analysis by PCR of short tandem repeats. **Leukemia.** 2011;25(9):1467–70.
  34. Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., dan Dashti, H. M. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. **Kuwait Med J.** 2009;41(2):117–22.
  35. Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., dan Chaves, S. DNA extraction: finding the most suitable method. In *Molecular microbial diagnostic methods.* 2016. p. 135–154.
  36. Zhu, K., Jin, H., He, Z., Zhu, Q., dan Wang, B. A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis. **Nature protocols.** 2007;1(6):3088–93.
  37. Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. **Vol. 8, Micromachines.** 2017.
  38. Grigorov E, Kirov B, Marinov MB, Galabov V. Review of microfluidic methods for cellular lysis. **Vol. 12, Micromachines.** 2021.
  39. Delaney, S., Murphy, R., dan Walsh, F. A comparison of methods for the extraction of plasmids capable of conferring antibiotic resistance in a human pathogen from complex broiler cecal samples. **Frontiers in microbiology.** 2018;9(AUG).
  40. Dayanti, F. G., Djuminar, A., Dermawan, A., dan Tantan, A. Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Hasil Ekstraksi Dna *Salmonella typhi* Menggunakan Metode Boiling, NaOH, Kit Komersial. **Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung.** 2011;11(1):350–7.
  41. Miura, N. N., Miura, T., Ohno, N., Adachi, Y., Watanabe, M., Tamura, H., Tanaka, S., dan Yadomae, T. Gradual solubilization of *Candida* cell wall  $\beta$ -glucan by oxidative degradation in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology.** 1998;21(2):123–9.
  42. Zamani, A., Edebo, L., Sjöström, B., dan Taherzadeh, M. J. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. **Biomacromolecules.** 2007;8(12):3786–90.
  43. G-Biosciences. Plasmid Isolation (Alkaline Lysis). In: *Plasmid Isolation (Alkaline Lysis) Teacher's Guidebook.* 2016. p. 20.
  44. Zhu, Q., dan Wu, S. Water-soluble  $\beta$ -1, 3-glucan prepared by degradation of curdlan with hydrogen peroxide. **Food chemistry.** 2019;283:302–4.
  45. Fredricks, D. N., Smith, C., dan Meier, A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal of clinical microbiology.** 2005;43(10):5122–5128.
  46. Sari, S. K., Listyorini, D., Mazieda, M. N., dan Sulasmi, E. S. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Daun Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) Menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) GENE AID. In **Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning.** 2014;65–70.
  47. Fitriya, R. T. Keefektifan metode isolasi DNA kit dan CTAB/NaCl yang dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. **LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi.** 2015;4(1):87–92.
  48. Yoshimi A, Miyazawa K, Abe K. Cell wall structure and biogenesis in aspergillus species. **Vol. 80, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 2016. p. 1700–11.
  49. Li, X., Kuromi, H., Briggs, L., Green, D. B., Rocha, J. J., Sweeney, S. T., & Bullock, S. L. Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. **The EMBO journal.** 2010;29(5):992–1006.
  50. Thermo Fisher Scientific. Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. Nucleic Acid [Internet]. 2010;11:1–30. Available from:

- www.nanodrop.com
51. BioRad. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3  
User's Manual. No J [Internet].  
2012;11(1):10. Available from:  
www.nanodrop.com