

PERBANDINGAN KUALITAS DAN KUANTITAS EKSTRAK DNA *Staphylococcus aureus* ANTARA ALKALINE LYSIS DAN KIT BERBASIS FILTER

Dila Prasetya Belinda, Muhammad Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *S. aureus* merupakan penyebab infeksi nosokomial dan dapat menimbulkan sepsis, sehingga perlu penegakkan diagnosis yang cepat menggunakan metode deteksi berbasis DNA. Ekstraksi DNA yang umum dilakukan adalah berbasis filter (KBF) yang mahal. *Alkaline Lysis* (AL) merupakan metode ekstraksi DNA yang sederhana dan ekonomis, namun tingkat kualitas dan kuantitas ekstrak DNA pada *S. aureus* masih belum diketahui.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* menggunakan bakteri *S. aureus* VT003221 untuk mendapatkan ekstrak DNA dengan metode AL dan KBF. Konsentrasi bakteri yang digunakan adalah 10^8 dan 10^{12} CFU/ml, dengan NS sebagai kontrol. Hasil ekstrak DNA diuji kualitas dan kuantitas dengan spektrofotometri nanodrop. Data di analisa dan $p < 0,05$ dianggap signifikan.

Hasil: Kuantitas ekstrak DNA metode AL pada kontrol, 10^8 dan 10^{12} CFU/ml adalah $0,80 \pm 0,44$, $3,80 \pm 0,83$, dan $14,20 \pm 3,34$ $\mu\text{g/ml}$ dengan kualitas $-0,29 \pm 0,05$, $1,49 \pm 0,16$, $1,97 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). Sedangkan KBF pada kontrol, 10^8 dan 10^{12} CFU/ml kuantitasnya 0, $5,20 \pm 1,78$, dan $35,40 \pm 12,46$ $\mu\text{g/ml}$ dengan kualitas 0, $2,00 \pm 0$, $1,84 \pm 0,02$. Hasil kualitas dari kedua metode baik karena berada pada rentang nilai 1.8 – 2.0, namun kurang baik pada konsentrasi 10^8 CFU/ml dari metode AL, sedangkan dari kuantitasnya metode KBF lebih tinggi dibandingkan AL. Hal ini diduga terjadi karena KBF lebih detail dibandingkan dengan AL.

Kesimpulan: Metode Kit Berbasis Filter menghasilkan ekstrak DNA yang lebih baik secara kualitas dan kuantitas dibandingkan AL dalam mengekstraksi DNA *S. aureus*

Kata Kunci: Ekstraksi DNA, *Staphylococcus aureus*, *Alkaline Lysis*, Kit Berbasis Filter

*Korespondensi:

Rio Risandiansyah

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

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

THE QUALITY AND QUANTITY COMPARISON OF DNA EXTRACT *Staphylococcus aureus* BETWEEN ALKALINE LYSIS AND FILTER BASED KIT

Dila Prasetya Belinda, Muhammad Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*

*Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: *S. aureus* is a cause of nosocomial infection that can cause sepsis, so it is necessary to enforced rapid diagnosis using DNA-based detection method. Common DNA extraction with Filter Based Kit is expensive. Alkaline lysis is a simple and economical method of DNA extraction, but the level of quality and quantity of DNA extract in *S. aureus* still unknown.

Method: Research experimental laboratory *in vitro* using DNA extraction *S. aureus* bacteria with code VT003221 to obtain DNA extracts with the AL and KBF methods. The concentrations of bacteria used 10^8 and 10^{12} CFU/mL, with NS as a control. DNA extract results are tested for quality and quantity with nanodrop spectrophotometry. Data in analyzed and $p < 0.05$ is significant.

Result: The quantity of DNA extracts of the AL method on control, 10^8 and 10^{12} CFU/ml is 0.80 ± 0.44 , 3.80 ± 0.83 , and 14.20 ± 3.34 $\mu\text{g/ml}$ with quality -0.29 ± 0.05 , 1.49 ± 0.16 , 1.97 ± 0.06 ($p < 0.05$). While the KBF on control, 10^8 and 10^{12} CFU / ml obtained quantity 0, 5.20 ± 1.78 , and 35.40 ± 12.46 $\mu\text{g} / \text{ml}$ with quality 0, 2.00 ± 0 , 1.84 ± 0.02 . The quality results of these two methods are good because they are in the range of values 1.8 - 2.0, but less good at the concentration of 10^8 CFU / ml of the AL method, while from the quantity the KBF method is higher than AL. This is thought to occur because KBF is more detailed compared to AL.

Conclusion: The Filter-Based Kit Method produces DNA extracts that are better in quality and quantity than AL in extracting DNA *S. aureus*.

Keyword: DNA extraction, *Staphylococcus aureus*, *Alkaline Lysis*, *Filter Based Kit*

*Correspondence:

Rio Risandiansyah

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

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial dengan prevalensi 9,8% atau lebih dari 1,4 juta pasien rawat inap di seluruh dunia.¹ *S. aureus* ini dapat menimbulkan berbagai infeksi supuratif dengan angka keparahan yang bervariasi pada jaringan lunak, jaringan tulang, organ pernafasan serta jaringan endovaskuler. Manifestasi dari infeksi *S. aureus* ini dapat berupa impetigo, *scalded skin syndrome*, endocarditis, sindrom syok toksik dan sepsis.²

Saat ini, proses identifikasi bakteri masih membutuhkan waktu yang cukup lama dengan metode yang biasa digunakan seperti kultur dan uji biokimiawi.³ Sehingga pasien yang terinfeksi bakteri perlu dilakukan penegakkan diagnosis secara cepat. Salah satu metode identifikasi bakteri yang cepat ialah metode deteksi DNA.⁴ Metode deteksi DNA berbasis amplifikasi seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mulai digunakan karena memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi untuk diagnosis penyakit infeksi.⁴ Namun, tingkat keberhasilan PCR tergantung dari hasil kualitas dan kuantitas sampel DNA yang diperoleh dari proses ekstraksi DNA.^{14,15} Prinsip ekstraksi DNA yaitu penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari komponen pengganggu, dan presipitasi DNA.^{5,7}

Metode ekstraksi DNA yang umumnya digunakan yaitu Kit Berbasis Filter.⁶ Untuk menghasilkan ekstrak DNA metode ini tergolong mahal karena membutuhkan kit reagen tertentu serta langkah pengerjaannya yang kompleks.⁶ Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan dengan metode sederhana yaitu metode *Alkaline Lysis* yang ditinjau dari segi waktu lebih singkat dan minim biaya.⁷ Selain itu, dari penelitian (Kumalasari *et al.*, 2020) hasil dari perbandingan kualitas dan kuantitas ekstrak *S. aureus* menggunakan metode *Heat Treatment* dan KBF pada konsentrasi 10^1 - 10^5 CFU/mL masih rendah dimana kuantitasnya kurang dari 10 µg/ml dan kualitasnya A_{260}/A_{280} tidak berada pada *range* 1,8-2,0.¹¹ Sehingga, peneliti ingin melihat kualitas dan kuantitas ekstrak DNA *S. aureus* pada konsentrasi 10^8 dan 10^{12} CFU/mL menggunakan metode *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter.

Kualitas dan kuantitas DNA bakteri dapat dilihat berdasarkan kemurnian dan *yield*.⁸ Kualitas DNA (*purity*) dan kuantitas DNA (*yield*) yang dihasilkan dari ekstraksi dapat bervariasi mengikuti jumlah sel dan metode ekstraksi DNA yang digunakan.⁹ Belum ada penelitian membahas mengenai perbandingan kualitas dan kuantitas ekstrak DNA *S. aureus* antara *Alkaline Lysis* dengan Kit Berbasis Filter. Maka dari itu, penelitian ini akan membandingkan antara metode ekstraksi DNA yang sederhana dengan metode kit komersial.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu, dan Tempat Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan desain analitik kuantitatif yang dilaksanakan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Mei-Juni 2021.

Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan bakteri *S. aureus* dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah dideterminasi. Untuk peremajaan dan membuat stok bakteri ditumbuhkan langsung pada cawan petri yang berisi *Mannitol Salt Agar* kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-20 jam.

Perhitungan kuantifikasi jumlah koloni bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Jumlah koloni dihitung menggunakan *colony counter*. Pada penelitian ini, proses TPC diawali dengan pengenceran mulai dari 10^{-1} hingga 10^{-12} yang bertujuan untuk dapat menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri dalam *range* 30-300 CFU/g.¹²

Ekstraksi DNA Menggunakan Metode *Alkaline Lysis*

Suspensi bakteri *S. aureus* sebanyak 1 ml dari masing – masing konsentrasi di pindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml. Suspensi bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Buang supernatan dan disentrifugasi kembali hingga pelletnya kering. Selanjutnya, pada proses pelisisan ditambahkan 150 µl *resuspension buffer* (1 M glukosa, 1 M Tris-Cl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8, *de-ion water*), 200 µl *lysis solution* (0,2 N NaOH, 1% SDS, *de-ion water*) dan pada proses purifikasi ditambahkan 300 µl *neutralization solution* (5 M *sodium acetate*, *glacial acetic acid*, *de-ion water*). Kemudian, pada tahap presipitasi ditambahkan sebanyak 300 µl isopropanol dan dikocok 2 kali. Selanjutnya diinkubasi pada -20°C selama 30 menit. Pada tahap purifikasi juga ditambahkan 600 µl *ethanol* 70% dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, pellet dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 30 menit lalu dilarutkan dalam 50 µl TE. Kemudian dilakukan pengukuran kuantitas dan kemurnian dengan NanoDrop.

Ekstraksi DNA Menggunakan Metode Kit Berbasis Filter

Metode ekstraksi DNA dilakukan mengikuti petunjuk dari produsen dari kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System A2360. Suspensi bakteri *S. aureus* sebanyak 1 ml dari masing – masing konsentrasi pada proses pelisisan sel ditambahkan 150µl Wizard® SV *Lysis Buffer* dan 20 µl lisozim

diinkubasi 37°C selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi 13.000 x g selama 3 menit. Selanjutnya pada proses purifikasi ditambahkan 650µl *Column Wash Solution* (dengan penambahan 95% *ethanol*) dan disentrifugasi 13.000 x g selama 1 menit, cairan yang terbentuk di *Collection Tube* dibuang kembali dan langkah ini diulang sebanyak 4 kali. Proses presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan 250µl *Nuclease-Free Water* dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar. Setelah itu, *minicolumn elution tube* disentrifugasi 13.000 x g selama 1 menit sehingga didapatkan volume total elusi sebanyak 250µl. Terakhir, *minicolumn* dilepas dari *Collection Tube*. *Collection Tube* tersebut berisi DNA yang telah terfilter. Proses selanjutnya yaitu pengukuran kuantitas dan kemurnian dengan NanoDrop.

Pengukuran Kuantitas dan Kualitas

Hasil kuantitas dapat dilihat pada kolom *concentration* spektrofotometer NanoDrop (Biodrop) sedangkan hasil Kualitas DNA dinyatakan baik apabila rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,8-2,0 dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,0-2,2.^{10,14} Apabila nilai di bawah 1,8 hal ini menunjukkan adanya kontaminasi protein dan larutan fenol pada sampel. Sedangkan nilai diatas 2,0 mengindikasikan adanya kontaminasi dengan RNA.^{10,11}

Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan uji statistic *One Way Analysis of Varians* (ANOVA). Kemudian dapat dilakukan uji lanjutan *Post Hoc Analitic Least Significant Difference* (LSD). Hasil dinyatakan signifikan jika $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Kualitas DNA *S. aureus* dengan metode *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter

Hasil kualitas AL dan KBF ditunjukkan pada Tabel 2. Pada metode AL kualitas dideteksi pada kontrol, konsentrasi 10^8 CFU/ml, dan 10^{12} CFU/ml dengan rata – rata masing – masing (-0,29, 1,49, 1,97). Sedangkan metode KBF kualitas dideteksi pada kontrol, konsentrasi 10^8 CFU/ml, dan 10^{12} CFU/ml dengan rata – rata masing – masing (0, 2,00, 1,84). Nilai kualitas dari kontrol dan konsentrasi 10^8 pada metode AL memiliki hasil yang kurang baik karena tidak berada pada angka 1,8 – 2,0.

Uji statistik kualitas pada metode AL dan KBF menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p=0,00$) pada masing – masing konsentrasi. Uji *post hoc* LSD pada metode AL diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) antara kontrol dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml. Pada kontrol berbeda

signifikan ($p < 0,05$) dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml. Konsentrasi 10^8 CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kontrol dan 10^{12} CFU/ml. Konsentrasi 10^{12} CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kontrol dan 10^8 CFU/ml. Sehingga, pada metode AL dan KBF dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml, 10^{12} CFU/ml dan kontrol berdasarkan hasil kualitas dan kuantitasnya diperoleh hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dari kedua metode.

Kuantitas DNA *S. aureus* dengan metode *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter

Hasil kuantitas metode *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter pada *S. aureus* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kuantitas metode *Alkaline Lysis* dengan Kit Berbasis Filter Pada *S. aureus*

Konsentrasi (CFU/ml)	Kuantitas (µg/ml)	
	<i>Alkaline Lysis</i>	Kit Berbasis Filter
Kontrol	0,80 ± 0,44	0
10^8	3,80 ± 0,83	5,20 ± 1,78
10^{12}	14,20 ± 3,34	35,40 ± 12,46

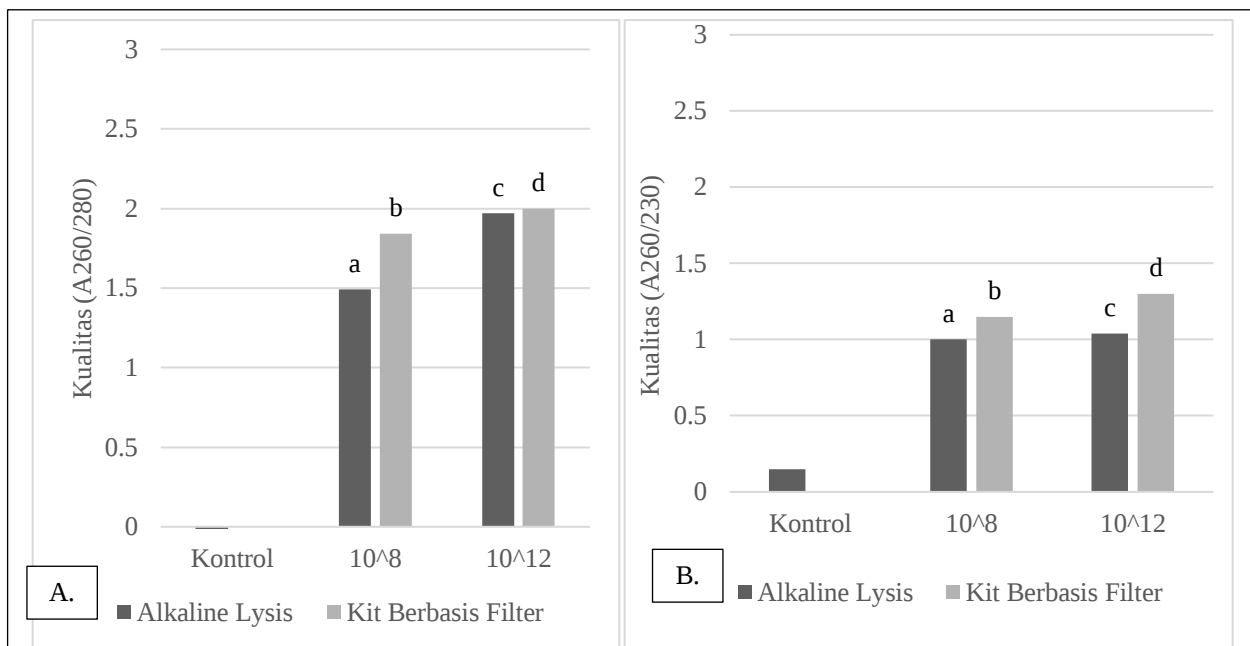
Keterangan: Data hasil rata – rata kuantitas *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter dalam mean ± SD

Uji statistik kuantitas pada metode *Alkaline Lysis* dan Kit Berbasis Filter menunjukkan adanya hasil perbedaan signifikan ($p=0,00$) pada masing – masing konsentrasi . Uji *post hoc* LSD pada metode *Alkaline Lysis* diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) antara kontrol dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml. Pada konsentrasi 10^8 CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kontrol dan 10^{12} CFU/ml. Konsentrasi 10^{12} CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kontrol dan 10^8 CFU/ml.

PEMBAHASAN

Pengaruh Jumlah Sel terhadap Kualitas dan Kuantitas

Dari hasil penelitian didapatkan kuantitas ekstrak DNA *S. aureus* pada konsentrasi 10^{12} CFU/mL lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL pada masing-masing metode. Hal tersebut dikarenakan kuantitas hasil ekstraksi DNA dapat dipengaruhi oleh jumlah sel.¹⁶ Rendahnya kuantitas yang dihasilkan dikarenakan jumlah sel yang rendah sehingga menyebabkan DNA yang dihasilkan juga rendah.²¹ Sedangkan, semakin tinggi jumlah sel pada sampel maka semakin tinggi juga kuantitas DNA yang dihasilkan.²¹



Gambar 1A. Grafik Perbandingan Kualitas A_{260}/A_{280} Alkaline Lysis dengan Kit Berbasis Filter

Gambar 1B. Grafik Perbandingan Kualitas A_{260}/A_{230} Alkaline Lysis dengan Kit Berbasis Filter

Keterangan: Kualitas A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} dari metode Alkaline Lysis dengan Kit Berbasis Filter pada kontrol, konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml, dan 10^{12} CFU/ml.

Dalam rata – rata $\pm$ SD, * $p < 0,05$ notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil kualitas ekstrak DNA *S. aureus* pada metode KBF menunjukkan kemurnian yang baik pada semua konsentrasi. Sedangkan, metode AL didapatkan kualitas yang baik hanya pada konsentrasi 10^{12} CFU/mL. Kualitas yang rendah dapat disebabkan oleh konsentrasi bakteri yang rendah sehingga protein dan kontaminan juga rendah mengakibatkan hasil kualitas tidak terbaca oleh spektrofotometer NanoDrop.¹⁷

Pengaruh Metode Alkaline Lysis dan Kit Berbasis Filter terhadap Kuantitas DNA

Metode ekstraksi DNA telah mengalami perkembangan mulai dari cara sederhana, ekonomis hingga menggunakan kit komersial.¹⁴ Metode ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan ekstrak DNA yang akan digunakan untuk melakukan tahapan lanjutan seperti *polymerase chain reaction* (PCR).¹⁵ Dalam pelaksanaan PCR mensyaratkan komponen ekstrak DNA yang digunakan memiliki kualitas dan kuantitas yang tinggi sehingga amplifikasi dapat berlangsung optimum.^{14,15} Hasil kuantitas ekstrak DNA yang selanjutnya dapat digunakan sebagai pemeriksaan PCR, yaitu lebih dari 10 μ g/ml.¹⁶

Kuantitas DNA diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometer nanodrop yang dilihat berdasarkan hasil kuantitas pada kolom *concentration* dengan satuan μ g/ml.¹⁷ Prinsip spektrofotometer nanodrop yaitu mengukur penyerapan sinar UV, jumlah sinar yang diserap DNA akan berbanding lurus dengan jumlah DNA

dalam sampel.¹⁰ Basa nitrogen akan mengabsorpsi sinar UV, semakin tinggi kuantitas DNA maka sinar UV akan semakin banyak yang terabsorpsi.¹⁰ Pengukuran kuantitas bertujuan untuk mengetahui jumlah DNA bakteri pada sampel.¹⁰

Alkaline Lysis melakukan proses ekstraksi menggunakan perlakuan basa sederhana yang prosesnya cukup mudah, cepat, murah, dan ramah lingkungan.⁷ Kerusakan dinding sel dapat terjadi jika sel kontak dengan basa kuat seperti NaOH yang digunakan pada penelitian ini.⁷ Pada tabel 2, hasil rerata konsentrasi metode AL pada sampel kontrol 0,80 μ g/ml, konsentrasi 10^8 CFU/ml 3,80 μ g/ml, dan konsentrasi 10^{12} CFU/ml 14,20 μ g/ml. Berdasarkan data tersebut kuantitas metode AL pada konsentrasi 10^8 CFU/ml tergolong rendah.¹⁶

Salah satu faktor yang mempengaruhi hasil kuantitas pada metode AL adalah tidak adanya pemberian lisozim. Lisozim ini berfungsi untuk menghancurkan dinding sel dari jenis bakteri gram-positif dengan cara menghidrolisis ikatan 1,4 antara asam N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin.¹³ Tanpa adanya penambahan lisozim pada metode AL akan membuat DNA dapat terpisah lebih sedikit yang menyebabkan jumlah DNA yang dihasilkan rendah akan berbanding lurus dengan jumlah sinar yang diserap oleh DNA.¹⁰ Selain itu, perbedaan hasil kuantitas dari masing – masing konsentrasi juga ditentukan oleh perlakuan fisik yang diberikan serta kemampuan buffer lisis dalam memecah sel.¹⁹ Adanya perlakuan fisik yang berlebihan dapat terjadi

dalam proses *pipeting*, pada saat mencampurkan larutan di *microtube* dengan dibolak-balik, proses setrifugasi, dan *vortex* sehingga komponen DNA rusak dan menghasilkan kuantitas DNA yang rendah.¹⁹

Hasil ekstraksi DNA menggunakan Kit Berbasis Filter (Wizard® SV Genomic DNA Purification System A2360) yang dirangkai dalam satu paket berisi berbagai macam reagen yang sesuai dengan prinsip ekstraksi DNA. Metode kit berbasis filter memiliki prinsip mulai dari penghancuran sel untuk mengeluarkan DNA, pemisahan komponen DNA, dan pemurnian DNA.²⁰ Pada tabel 2 hasil rata – rata konsentrasi metode KBF pada sampel kontrol 0 µg/ml, konsentrasi 10⁸ CFU/ml 5,20 µg/ml, dan konsentrasi 10¹² CFU/ml 35,40 µg/ml. Berdasarkan data tersebut kuantitas metode KBF pada konsentrasi 10¹² CFU/ml lebih tinggi dari konsentrasi 10⁸ CFU/ml.

Hal tersebut disebabkan karena jumlah konsentrasi bakteri 10¹² CFU/ml lebih banyak dari 10⁸ CFU/ml. Tingginya kuantitas pada metode KBF disebabkan oleh adanya proses pemisahan komponen non DNA yang dipengaruhi oleh *spin column filter* dan *column wash solution*.²² Setelah pemisahan komponen non-DNA pada metode KBF selanjutnya ada proses presipitasi DNA yang dipengaruhi oleh *spin column filter* dan *nuclease-free water*.²² Dari tahapan proses tersebut menghasilkan kuantitas yang tinggi pada metode Kit Berbasis Filter.

Pengaruh Metode Alkaline Lysis dan Kit Berbasis Filter terhadap Kualitas DNA

Kualitas DNA bakteri dapat ditinjau dari hasil kemurnian sampel. Kemurnian diukur menggunakan spektrofotometer Nanodrop dengan perbandingan absorbansi 260/280 nm. Hasil dikatakan murni apabila rasio perbandingan A₂₆₀/A₂₈₀ 1,8-2,0 dan A₂₆₀/A₂₃₀ sebesar 2,0-2,2.^{10,14,17} Pada panjang gelombang 260 nm menyerap DNA, 280 nm menyerap protein, dan 230 nm menyerap kontaminan (non-DNA/ non-protein).^{15,20} Apabila nilai di bawah 1,8 hal ini menunjukkan adanya kontaminasi protein dan larutan fenol pada sampel.¹⁰ Sedangkan nilai diatas 2,0 mengindikasikan adanya kontaminasi dengan RNA.¹⁰

Pada ekstraksi DNA menggunakan metode *Alkaline Lysis* diperoleh hasil kualitas dari rasio A₂₆₀/A₂₈₀ pada kontrol sebesar -0,29, konsentrasi 10⁸ CFU/ml 1,49, dan konsentrasi 10¹² CFU/ml 1,97. Sedangkan dari rasio A₂₆₀/A₂₃₀ hasil kualitas dibawah angka 2,0-2,2. Hasil kemurnian dibawah 1,8 pada kontrol dan konsentrasi 10⁸ CFU/ml menunjukkan bahwa terdapat kontaminan protein pada sampel.¹⁰ Rendahnya nilai kemurnian DNA hasil ekstraksi metode *Alkaline Lysis* karena proses purifikasi DNA hanya menggunakan etanol 70% dan dilakukan bersama-sama dengan langkah presipitasi DNA.²³

Etanol akan mengubah potensial ion dari DNA sehingga akan membuang molekul air yang berinteraksi dengan DNA.²⁴ Namun, saat proses purifikasi untuk menghilangkan fraksi etanol yang optimum pada DNA dapat digunakan pemanasan dalam temperatur 60°C agar etanol mudah dan cepat menguap sedangkan pada prosedur hanya menggunakan pemanasan suhu 50°C.^{23, 24}

Pada metode AL juga tidak menggunakan proteinase K yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminan berupa protein dengan cara mendegradasi protein.^{11,26} Selain itu, penggunaan natrium asetat juga dapat mempresipitasi protein dan debris sel yang sebelumnya mengalami proses pelisisan menggunakan detergen pelisis seperti *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB).²⁶ Adanya CTAB dapat memudahkan natrium asetat mepresipitasikan protein dan debris sel.²⁶ Namun, sebagai pengganti proteinase K pada metode AL menggunakan natrium asetat tanpa menggunakan CTAB.²³ Sehingga, hasil kualitas yang didapatkan rendah karena penggunaan natrium asetat tidak cukup efektif menggantikan fungsi proteinase K.²⁶

Kualitas DNA yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan ekstraksi, diantaranya yaitu faktor pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi ke dalam *microtube* yang baru dan pengeringan ekstrak harus dilakukan secara teliti supaya jaringan – jaringan yang telah hancur dan berada dibawah *microtube* tidak ikut terambil.²⁶ Selain itu, proses pengeringan DNA yang berupa pellet harus kering dari larutan sebelumnya dipakai untuk purifikasi.¹¹ Apabila pengeringan kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti *ethanol* 70% dapat menurunkan nilai kualitas DNA pada pengukuran menggunakan spektrofotometer Nanodrop.^{11,26}

Ekstraksi DNA pada metode KBF diperoleh hasil kualitas dari rasio A₂₆₀/A₂₈₀ pada kontrol yaitu 0, konsentrasi 10⁸ CFU/ml 2,00, dan konsentrasi 10¹² CFU/ml 1,84. Sedangkan, kualitas dari rasio A₂₆₀/A₂₈₀ dibawah 2,0-2,2 yang menandakan bahwa kontaminan yang diserap semakin rendah.¹⁵ Nilai kemurnian dikatakan baik apabila berada pada *range* 1,8-2,0, sehingga kemurnian pada metode KBF dari masing – masing konsentrasi memiliki kemurnian yang baik.

Hasil kualitas ekstraksi DNA pada metode KBF lebih baik daripada metode AL. Hal tersebut disebabkan oleh cara kerja pada metode kit komersial. KBF merupakan kit komersial berisi *spin column* dengan bahan pengikat *solid-phase* dimana mekanisme kerja pada metode ini dengan cara pengikatan ion-ion positif yang berada pada *spin column* terhadap molekul DNA yang di ekstraksi.²⁶ Hal tersebut bertujuan untuk memudahkan proses *binding*, *washing*, dan *elution* asam nukleat sehingga menghasilkan DNA dengan kualitas yang tinggi.²⁶

KESIMPULAN

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

1. Kuantitas DNA *S. aureus* hasil ekstraksi metode Kit Berbasis Filter lebih tinggi dibanding metode *Alkaline Lysis* secara signifikan pada semua konsentrasi bakteri.
2. Kualitas DNA *S. aureus* hasil ekstraksi metode Kit Berbasis Filter lebih tinggi dibanding metode *Alkaline Lysis* secara signifikan pada semua konsentrasi bakteri.

SARAN

Penelitian ini menyarankan hal – hal berikut untuk menunjang penelitian selanjutnya guna pengembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan.

1. Hasil ekstraksi DNA sebaiknya digunakan dalam uji lanjutan seperti PCR atau

DAFTAR PUSTAKA

1. Riani, Syafriani. Hubungan Antara Motivasi dengan Kepatuhan Perawat Melaksanakan Hand Hygiene Sebagai Tindakan Pencegahan Infeksi Nosokomial di Ruang Rawat Inap Rumah Sakit A. **J Ners [Internet]**. 2019;3(23):49–59. Available from: <https://journal.universitaspahlawan.ac.id/index.php/ners/article/view/405/340>
2. Diyantika D, Mufida DC, Misnawi M. The Morphological Changes of Staphylococcus Aureus Caused by Ethanol extracts of Cocoa Beans (Theobama Cacao) through In Vitro. **J Agromedicine Med Sci**. 2017;3(1):25.
3. Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**. 2019;7(5).
4. Foo PC, Nurul Najian AB, Muhamad NA, Ahamad M, Mohamed M, Yean Yean C, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: A comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on Entamoeba histolytica DNA derived from. **BMC Biotechnol**. 2020;20(1):1–15.
5. Syahputra A, Mutaqin KH, Damayanti TA. Komparasi Metode Isolasi DNA Patogen Antraknosa dan Bulai untuk Deteksi PCR. **J Fitopatol Indones**. 2016;12(4):124.
6. Dilhari A, Sampath A, Gunasekara C, Fernando N, Weerasekara D, Sissons C, et al. 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-

elektroforesis untuk memberikan gambaran keberhasilan lebih baik atau aplikatif.

2. Melakukan perbandingan kualitas dan kuantitas ekstrak DNA lebih dari konsentrasi 10^{12} CFU/mL.
3. Dilakukan pre-treatment sebelum pengukuran spektrofotometer nanodrop
4. Penggunaan metode *Alkaline Lysis* pada konsentrasi 10^{12} dapat dilakukan untuk ekstraksi DNA bakteri *S. aureus*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada ikatan orangtua mahasiswa (IOM) yang mendanai penelitian ini, tim kelompok penelitian yang telah membantu penelitian dan dr. Rahma Triliana, M.Kes, PhD sebagai *peer reviewer*.

- based DNA profiling method. **AMB Express**. 2017;7(1).
7. J Shetty P. The Evolution of DNA Extraction Methods. **Am J Biomed Sci Res**. 2020;8(1):39–45.
8. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **J Biomed Biotechnol**. 2009;2009.
9. Shi R, Lewis RS, Panthee DR. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. **PLoS One**. 2018;13(12):1–14.
10. Yahya A, Firmansyah M, Arlisyah A, Risandiansyah R. Comparison of DNA Extraction Methods Between Conventional, Kit, Alkali and Buffer-Only for PCR Amplification on Raw and Boiled Bovine and Porcine Meat. **J Exp Life Sci**. 2017;7(2):110–4.
11. Kumalasari RD, Risandiansyah R, Fadli Z, Perbandingan Metode Isolasi DNA Filter Based Kit dengan Heat Treatment Berdasarkan Limit of Detection dan Quantification pada Staphylococcus aureus Comparison DNA Isolatio Method Filter Based Kit with Heat Treatment Based on Limit of Detection and Quanti. **J Kedokt Komunitas**. 2020;8(2):101–7.
12. Syafaruddin, Randriani E, Santoso TJ. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi dna pada jambu mete. **J Ristri**. 2011;2(2):151–60.
13. Olson ND, Morrow JB. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. **BMC Res Notes [Internet]**. 2012;5(1):1. Available from: BMC Research Notes
14. Azizah A, Soesetyaningsih E. Akurasi

- Perhitungan Bakteri pada Daging Sapi Menggunakan Metode Hitung Cawan. **Berk Sainstek**. 2020;8(3):75.
15. Bunu SJ, Otele D, Alade T, Dodoru R. Determination of serum DNA purity among patients undergoing antiretroviral therapy using NanoDrop-1000 spectrophotometer and polymerase chain reaction. **Biomed Biotechnol Res J**. 2020;4(3):214–9.
 16. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. **Tech Bull NanoDrop Spectrophotometers**. 2015;1–2.
 17. Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. **Saudi J Biol Sci [Internet]**. 2017;24(7):1465–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.016>
 18. Sari, K. S., M. N. Mazieda., D. Listyorini. dan ESS. Optimasi Teknik Isolasi Dan Purifikasi DNA Pada Daun Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) Menggunakan Genommic DNA Mini Kit (PLANT) Geneaid. **Pendidik Biol FKIP UNS**. 2014;11(1):65–70.
 19. Ni'mah D, Fadli MZ, Risandiansyah R. Perbandingan Kuantitas dan Kualitas DNA *Bacillus* sp. antara Heat Treatment dan Filter berbasis Kit. **Biosaintropis (Bioscience-Tropic)**. 2021;6(2):86–95.
 20. Suhadi F, Sudrajat D, R ML. Deteksi *Mycobacterium Tuberculosis* Dengan Polymerase Chain Reaction (Pcr). 1996;II(April):391.
 21. Muhsinin S, Sulastri MM, Supriadi D. Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. Dengan Metode PCR. **J Sains Farm Klin**. 2019;5(3):191.
 22. Jiang MF, Hu MJ, Ren HH, Wang L. Molecular cloning and characterization of a new C-type lysozyme gene from yak mammary tissue. **Asian-Australasian J Anim Sci**. 2015;28(12):1774–83.
 23. Romlah S, Naully PG, Nuraisyah S. Perbandingan Efektivitas Metode Isolasi DNA (Boilling Water dan CTAB) Pada Bakteri *Klebsiella pneumoniae*. **Pros Pertem Ilm Nas Penelit Pengabdi Masy (PINLITAMAS 1) Dies Natalis ke-16 STIKES Jenderal Achmad Yani Cimahi PINLITAMAS 1**. 2018;1(1):627–33.
 24. Nurhayati, Betty SD. *Biologi Sel Dan Molekuler*. Jakarta: Indo.Kemenkes.BPPSDM, 2017; 2017. 303 p.
 25. Promega C. Wizard ® SV Genomic DNA Purification System. Components [Internet]. 2010;1123–6. Available from: [papers2://publication/uuid/96B2F682-0A28-4CDC-83AA-E7B8B5B58DAD](https://www.promega.com/resources/papers2/publication/uuid/96B2F682-0A28-4CDC-83AA-E7B8B5B58DAD)
 26. Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis T. *DNA Plasmid Isolation Using Alkaline Lysis Method*. 2018;(50 mL):10–2. Available from: http://2015.igem.org/wiki/images/3/30/ITB_I_NDONESIA_IGEM2015_DNA_Plasmid_isolation.pdf
 27. Puspitanungrum R, Adhiyanti C, Solihin. *Genetika molekuler dan aplikasinya*. 2018;75.
 28. Fitriya RT, Ibrahim M, Lisdiana L, Biologi J, Matematika F, Pengetahuan I, et al. Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* The Effectiveness of Modified DNA Isolation Method of Kit and CTAB/NaCl ON *Staphylococcus aureus* and *Shigella dysenteriae*. **LenteraBio Berk Ilm Biol [Internet]**. 2015;4(1). Available from: <http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabi> o

