

Perbandingan Metode Isolasi DNA *Filter Based Kit* dengan *Heat Treatment* Berdasarkan *Limit of Detection* dan *Quantification* pada *Staphylococcus aureus*

Ratna Dewi Kumalasari, Rio Risandiansyah*, Zainul Fadli
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *S.aureus* merupakan salah satu penyebab kematian pada kasus infeksi nosokomial, sehingga perlu dilakukan penegakan diagnosis secara cepat dan tepat menggunakan metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) berbasis DNA. Pada umumnya, metode isolasi DNA adalah dengan metode *filter based kit*, namun beberapa penelitian juga melihat perlakuan panas (*heat treatment*) sebagai penyederhanaan metode isolasi DNA. Namun kualitas dan kuantitas dari metode *filter based kit* dengan *heat treatment* belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan metode *filter based kit* dengan *heat treatment* berdasarkan *Limit of Detection* (LoD) dan *Limit of Quantification* (LoQ).

Metode: Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium *in vitro*. Isolasi DNA bakteri *S.aureus* dengan kode ATCC 14922 menggunakan metode *filter based kit* dan *heat treatment* pada konsentrasi bakteri $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, dan kontrol. Kedua metode ini dievaluasi dengan LoD dan LoQ berdasarkan perhitungan konsentrasi DNA (*yield*) dan kemurnian DNA (*puritas*) terekstraksi. Data dianalisis dengan uji Kruskal wallis dan dilanjutkan dengan post hoc analitic Mann Whitney signifikan apabila $p < 0.05$.

Hasil: Nilai LoD 2 ng/μl, LoQ 2 ng/μl pada metode *filter based kit*. Nilai ini terdeteksi pada konsentrasi bakteri 10^1 CFU/ml (*yield* $5 \pm 1,73$ ng/μl). Sedangkan, Nilai LoD 2,06 ng/μl, LoQ 6,11 ng/μl pada metode *heat treatment*. Nilai ini terdeteksi pada konsentrasi bakteri 10^4 (*yield* $3,67 \pm 0,58$ ng/μl). Kemurnian yang didapatkan tidak terdeteksi dan termasuk kurang baik (-5,0–5,0 pada *filter-based kit* dan 1,5–2,0 pada *heat treatment*)

Simpulan: Metode *filter based kit* lebih baik daripada metode *heat treatment* berdasarkan LoD dan LoQ.

Kata Kunci: Isolasi DNA, *Limit of Detection*, *Limit of Quantification*, *Staphylococcus aureus*.

Comparation DNA Isolatio Method Filter Based Kit with Heat Treatment Based on Limit of Detection and Quantification of *Staphylococcus aureus*

Ratna Dewi Kumalasari, Rio Risandiansyah*, Zainul Fadli
Medical Faculty, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: *S. aureus* is one of the causes of death in nosocomial infection, and therefore necessary to diagnosis quickly and accurately, such as by using DNA-based Polimerase Chain Reaction (PCR). Generally, the method of DNA isolation uses a filter-based kit method, but several studies also attempt heat treatment as a simplification of the DNA isolation method. However, the quality and quantity of the heat treatment compared filter-based kit method to is unknown. This research aims to compare heat treatment with filter-based kit method based on the Limit of Detection (LoD) and the Limit of Quantification (LoQ).

Method: This research used laboratory experimental *in vitro*. DNA isolation *S.aureus* bacteria with ATCC code 14922 uses filter based kit and heat treatment on bacterial concentration $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, and control. The method was evaluated by LoD and LoQ based on the calculation of DNA concentration (*yield*) and purity of extracted DNA (*purity*). Data were analyzed using Kruskal wallis and followed by post hoc analitic Mann whitney significant if $p < 0.05$.

Result: Based on DNA yield resulted in an LoD 2 ng/μl and an LoQ 2 ng/μl. This value was detected in 10^1 CFU/ml concentration (*yield* $5 \pm 1,73$ ng/μl). Meanwhile, heat-treatment resulted in an LoD of 2,06 ng/μl and an LoQ 6,11 ng/μl. This value was detected ini 10^4 CFU/ml bacterial concentrations (*yield* $3,67 \pm 0,57$ ng/μl). The purity obtained was not detected and was classified as poor (-5.0 - 5.0 in the filter based kit and 1.5 - 2.0 in the heat treatment)

Conclusion: Filter based kit method better than heat treatment method based on LoD and LoQ.

Keywords: DNA Isolation, *Limit of Detection*, *Limit of Quantification*, *Staphylococcus aureus*

*Correspondence author:

Rio Risandiansyah

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

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus adalah salah satu penyebab infeksi nosokomial dengan prevalensi mencapai 9% atau kurang lebih 1,40 juta pasien di seluruh dunia.¹ *S.aureus* yang menyebar ke pembuluh darah dapat menyebabkan sepsis² yaitu komplikasi dari infeksi yang dapat menjadi keadaan darurat seperti, syok sepsis, *multiple organ disfunctions* (MODs) hingga kematian.³ Sehingga pasien yang terinfeksi bakteri perlu dilakukan penegakkan diagnosis secara cepat dan tepat terhadap patogen penyebab infeksi. Salah satu metode untuk hal tersebut adalah dengan PCR, yang memerlukan proses isolasi DNA yang baik.⁴ PCR memiliki spesifitas dan sensitifitas yang tinggi untuk deteksi dini suatu penyakit.⁵ Namun, tingkat akurasi PCR tergantung dari kualitas dan kuantitas sampel DNA yang didapatkan melalui proses isolasi DNA.

Prinsip isolasi DNA terdiri dari pelisisan dinding sel, penghilangan komponen non-DNA, dan pemurnian DNA.⁶ *S.aureus* memiliki komponen-komponen yang akan mempengaruhi kualitas dan kuantitas isolat DNA seperti protein, lipid, dan karbohidrat. Metode isolasi DNA menggunakan kit yang telah digunakan secara umum adalah metode *filter based kit*. Untuk menghasilkan sampel DNA metode *filter based kit* membutuhkan proses yang panjang sehingga memakan waktu beberapa jam, selain itu dari segi harga metode ini tergolong mahal.⁷ Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan penyederhanaan metode yakni metode *heat treatment* yang lebih sederhana dari segi waktu yang relatif lebih singkat dengan biaya yang lebih murah daripada metode *filter based kit*.⁸ Metode *heat treatment* dilakukan dengan memanaskan bakteri pada aquades bersuhu 100°C selama 10 menit. Adanya pemanasan akan menyebabkan denaturasi protein sehingga dapat menghancurkan dinding sel bakteri dan mengeluarkan materi genetik dari sel.⁹

S.aureus memiliki dinding yang tersusun atas peptidoglikan yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif.¹⁰ Peptidoglikan, suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit yang terangkai, merupakan eksoskeleton kaku pada dinding sel.¹¹ Adanya karakteristik yang dimiliki oleh suatu bakteri akan berpengaruh terhadap hasil isolasi DNA secara kualitas dan kuantitas sampel DNA. Metode isolasi DNA yang berbeda akan memiliki keefektifan yang berbeda pula dalam mendapatkan kualitas kuantitas DNA yang baik. Sehingga, pada penelitian ini dilakukan perbandingan dua metode untuk mengetahui hasil isolat DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik berdasarkan LoD dan LoQ.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan desain penelitian analitik kuantitatif. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA) pada bulan Desember 2019 – April 2020. Sampel yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dengan kode ATCC 14922 yang dibiakkan dalam media *Nutrient Broth* (NB). Kemudian dilakukan isolasi DNA *S.aureus* dengan metode *filter based kit* dan *heat treatment* untuk kemudian dihitung LoD dan LoQ.

Inokulasi Bakteri

Bakteri *S.aureus* diambil menggunakan *oshe* dengan jumlah tiga *oshe* dari stok media padat dari laboratorium terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. Bakteri kemudian ditumbuhkan ke stok media cair *Nutrient Broth* (NB) yang terdiri dari *beef extract* 3 g/L, NaCl 5 g/L dan *peptone* 10 g/L. Bakteri disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-20 jam hingga media keruh. Hasil dari media cair (*Nutrient broth*) dibiakkan dalam cawan petri yang berisi media padat *Nutrient Agar* (NA) yang terdiri *beef extract* 10 g/L, *peptone* 10 g/L, NaCl 5 g/L, dan agar 15 g/L. Setelah itu bakteri diambil menggunakan cawan petri dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml *normal saline* (NS) lalu dihomogenkan.

Kuantifikasi Bakteri

Bakteri diencerkan dengan NS dengan cara menyiapkan 12 *tube* berisi NS sebanyak 1,350 µl. Selanjutnya stok yang berisi 20 ml NS diambil sebanyak 150 µl dan diencerkan pada setiap tabung reaksi mulai dari pengenceran 10⁻¹ sampai pada pengenceran 10⁻¹². Disiapkan juga tiga kontrol yang berisi NS tanpa mengandung bakteri. Bakteri dihitung menggunakan dua metode, metode pertama perhitungan secara *indirect* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) = 600 nm. Kedua, perhitungan menggunakan metode *total plate count* (TPC) dengan menginokulasi bakteri pada media NA yang telah dibagi menjadi 8 bagian berdasarkan pengenceran 10⁻⁵ - 10⁻¹².

Masing-masing bagian ditetaskan sesuai dengan tingkat pengencerannya sebanyak 10 µl cairan NS yang berisi bakteri *S.aureus*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-20 jam. Setelah diinkubasi, bakteri *S.aureus* akan tumbuh dan membentuk koloni. Jumlah koloni tersebut dihitung menggunakan *colony counter* berdasarkan daerah pengenceran yang sudah ditentukan.

Isolasi DNA Menggunakan Metode *Filter Based Kit*

Bakteri dengan sebanyak 5 *oshe* diambil dari stok bakteri kemudian dilarutkan dengan NS. Selanjutnya bakteri diencerkan sebanyak 4 kali yaitu pada 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} pada *tube*. Selanjutnya menambahkan 1 ml bakteri yang telah dibiakkan ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml dan di sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 1 menit, lalu supernatannya dibuang. Selanjutnya, ditambahkan 100

Hasil pengenceran dan perhitungan bakteri menggunakan metode *total plate count (TPC)*, diambil 10^1 – 10^5 CFU/ml kemudian diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop Biodrop pada $\lambda = 230, 260$, dan 280 nm yang diulang 3 kali. Hasil *yield* dilihat pada kolom *concentration* pada spektrofotometer nanodrop dan hasil puritas dikatakan baik apabila 1,8–2,0 pada A260/280.¹²

Tabel 1. Hasil Kuantifikasi *S.aureus*

Batch	Faktor Pengenceran								Bakteri (CFU/ml)	Absorbansi 600 nm
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}		
1	9	2	0	0	0	0	0	0	9×10^5	0,117
2	22	0,67	0	0	0	0	0	0	22×10^5	0,134
3	18,33	1,67	0	0	0	0	0	0	$18,33 \times 10^5$	0,175

Keterangan: Tabel 1 menunjukkan hasil kuantifikasi *S.aureus* menggunakan metode TPC dan Turbidimetri (spektrofotometri)

μ l *EL buffer* dan dicampurkan dengan *pellet*. Lalu diinkubasi selama 10-60 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 100 μ l *RS buffer*, 10 μ l *PK solution* lalu dicampur rata. Selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 56°C, dan ditambahkan 200 μ l *GA buffer*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g. Kemudian, supernatan dipindahkan ke *tube* baru yang steril dan ditambahkan 400 μ l *BA buffer* dan dicampur rata. Selanjutnya, campuran dipindahkan ke *spin column*, di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. Ditambahkan 500 μ l *G buffer* ke *spin column* dan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit.

Setelah itu, ditambahkan 500 μ l *washing buffer* pada *spin column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit lalu cairannya dibuang dan langkah ini diulang sebanyak dua kali. Selanjutnya, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit, lalu *spin column* dipindahkan ke *tube* baru yang steril. Ditambahkan 100 μ l *elution buffer* dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan. Selanjutnya, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit dan dilepaskan *spin column* dari *tube* yang telah berisi DNA.

Isolasi DNA Menggunakan Metode *Heat Treatment*

Bakteri dengan jumlah 5 *oshe* diambil dari stok bakteri kemudian dilarutkan dengan NS. Selanjutnya bakteri diencerkan sebanyak 4 kali yaitu pada 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} pada *tube*. Bakteri yang sudah diencerkan kemudian di panaskan dengan aquades bersuhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu bakteri disentrifugasi dalam kecepatan 9168 x g selama 5 menit. Kemudian bakteri diberi larutan *DNA solution rehydration*.

Pengukuran *Yield* dan Puritas

Perhitungan LoD dan LoQ

Menurut pedoman validasi metode oleh pusat kimia LIPI, LoD dan LoQ ditentukan dengan mengukur respon blanko, selanjutnya ditentukan standar deviasi dari perhitungan rata-rata analisa hasil. Berdasarkan pedoman validasi metode oleh pusat kimia LIPI, nilai limit deteksi dan kuantisasi dapat ditentukan dengan persamaan¹³:

$$\text{LoD} = A + 3 \text{ SD}$$

$$\text{LoQ} = A + 10 \text{ SD}$$

Keterangan:

LoD = *Limit of Detection*

LoQ = *Limit of Quantification*

A = Nilai rata-rata hasil analisis blanko

SD = Standar Deviasi (simpangan baku) hasil analisis blanko

Analisa Data

Hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk data kuantitatif dan dilakukan analisa data menggunakan uji *Analysis Of Variance (ANOVA)* dan dilanjutkan dengan *Post hoc analitic Least Significant Differences (LSD)* untuk mengetahui perbedaan signifikan pada tiap konsentrasi bakteri. Apabila syarat Anova tidak terpenuhi maka dilakukan uji non - parametrik yaitu *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan *post hoc analitic Mann Whitney*. Hasil dianggap signifikan apabila $p < 0,05$.

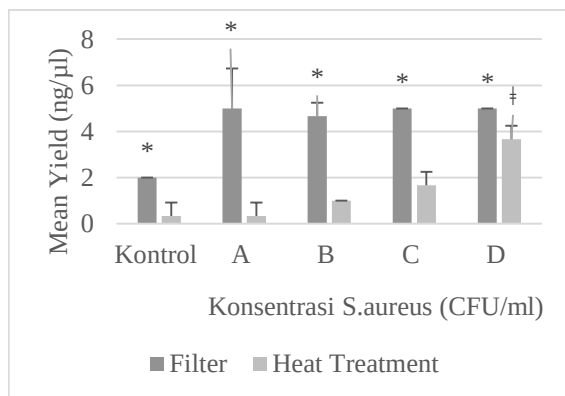
HASIL PENELITIAN

Hasil Kuantifikasi *S.aureus*

Berdasarkan hasil kuantifikasi *S.aureus* menggunakan metode *Total Plate Count (TPC)* dan metode turbidimetri ditunjukkan pada Tabel 1.

Kuantifikasi bakteri dilakukan untuk menganalisis jumlah bakteri, pada penelitian ini dilakukan menggunakan dua metode yakni TPC dan metode turbidimetri. Hasil metode TPC dengan menghitung rata-rata jumlah koloni pada masing-masing faktor pengenceran yang dikultur pada media agar. Hasil perhitungan TPC *S.aureus* ditunjukkan pada Tabel 1 didapatkan jumlah bakteri CFU/ml pada *Batch* 1 sebesar 9×10^5 , *batch* 2 sebesar 22×10^5 , dan *batch* 3 sebesar $18,33 \times 10^5$. Sedangkan, turbidimetri dihitung berdasarkan kekeruhan suatu sampel yang ditunjukkan oleh Tabel 1 spektrofotometri pada absorbansi 600 nm dari *S.aureus* dengan faktor pengenceran 10^{-5} adalah 0,117, 0,134, dan 0,175 pada *batch* 1,2, dan 3. Dari hasil diatas, dapat disimpulkan bahwa pengenceran yang digunakan berdasarkan konsentrasi masing-masing *batch*.

Hasil dan Analisa Data Yield Filter Based Kit dengan Heat Treatment pada *S.aureus*



Gambar 1 Perbandingan Yield Filter dan Heat Treatment

10^3	5 ± 0	$1,667 \pm 0,577$
10^4	5 ± 0	$3,667 \pm 0,577$

Keterangan: Tabel 2 menunjukkan perbandingan nilai yield (ng/μl) antara metode *filter based kit* dengan metode *heat treatment*

Data yield dalam rata – rata $\pm$ SD dengan $n = 3$

Hasil perbandingan yield antara *filter based kit* dengan *heat treatment* pada *S.aureus* berdasarkan konsentrasinya terdapat pada Tabel 2 dan Gambar 1

Keterangan: Gambar 1 adalah yield *filter based kit* dan *heat treatment* pada kontrol, konsentrasi bakteri 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml

Data dalam rata – rata $\pm$ SD, * $p < 0.05$ *filter based kit* vs *heat treatment* pada masing – masing konsentrasi ‡ $p < 0.05$ vs 10^1 , 10^2 , 10^3 pada metode *heat treatment*

Pada Tabel 2 menunjukkan rata – rata nilai yield dalam tiga kali ulangan pada *filter based kit* lebih tinggi daripada *heat treatment*. Pada gambar 1 menunjukkan nilai uji statistik. Uji Mann Whitney menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara metode *filter based kit* dengan *heat treatment* pada masing – masing konsentrasi bakteri. Hasil uji statistik metode *filter based kit* data didapatkan tidak signifikan ($p > 0,05$). Sedangkan pada metode *heat treatment* uji Kruskal wallis didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$). Uji post hoc Mann whitney didapatkan hasil signifikan pada konsentrasi bakteri 10^4 terhadap kontrol, konsentrasi bakteri 10^1 , 10^2 , dan 10^3 .

Hasil dan Analisa Data Kemurnian antara Filter Based Kit dengan Heat Treatment

Hasil perbandingan kemurnian antara *filter based kit* dengan *heat treatment* pada *S.aureus* berdasarkan konsentrasinya terdapat pada Tabel 3

Tabel 2 Perbandingan Kemurnian antara Filter Based Kit dengan Heat Treatment

Konsentrasi (CFU/ml)	Kemurnian (A260/280)	
	Filter Based Kit	Heat Treatment
	Range	Range
Kontrol	2,0 – 2,0	n.d
10^1	2,0 – 3,0	n.d
10^2	-4,0 – 5,0	n.d
10^3	n.d	n.d
10^4	-5,0 – 5,0	1,5 – 2,0

Keterangan: Tabel 5.3. Menunjukkan perbandingan nilai kemurnian (ng/μl) antara metode *filter based kit* dengan metode *heat treatment*

Data kemurnian dalam range dengan $n = 3$.

n.d = not detected

Nilai kemurnian diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop dengan absorbansi 260/280 pada metode *filter based kit* dan *heat treatment* ditunjukkan pada tabel 5.3. Nilai kemurnian pada kedua metode memiliki hasil yang kurang baik karena tidak berada pada angka 1,8 – 2.0.

Tabel 4. Perhitungan LoD dan LoQ pada *S.aureus*

	Rumus	Perhitungan		Hasil	
		Filter	Heat Treatment	Filter	Heat Treatment
LoD (ng/μl)	A + 3 SD	2 + 3 x 0	0,33 + 3 x 0,57	2	2,04
LoQ (ng/μl)	A + 10 SD	2 + 10 x 0	0,33 + 10 x 0,57	2	6,03

Keterangan: Tabel 4 menunjukkan nilai LoQ = LoD (*filter*) dan nilai LoQ > LoD (*heat treatment*)

Perhitungan LoD, dan LoQ pada *S.aureus*

Perhitungan LoD, dan LoQ *S.aureus* pada metode *filter based kit* dan *heat treatment* ditunjukkan pada Tabel 5.4

Pada Tabel 4 diketahui bahwa *filter based kit* memiliki nilai LoQ = LoD yaitu 2 (ng/μl), sedangkan pada *heat treatment* memiliki nilai LoQ > LoD.

PEMBAHASAN

Kuantifikasi *S.aures* dengan metode *Total Plate Count* (TPC) dan *Turbidimetri*

Kuantifikasi *S.aureus* pada penelitian ini dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode TPC dan secara kualitatif menggunakan metode *Turbidimetri*. Kuantifikasi menggunakan metode TPC bertujuan untuk menghitung jumlah bakteri hidup pada sampel.¹⁴ Pada penelitian ini dilakukan pengenceran mulai dari 10^{-1} – 10^{-12} kali untuk mengetahui sebaran jumlah koloni sampel pada setiap faktor pengenceran. Faktor pengenceran berbanding terbalik dengan jumlah koloni, semakin tinggi faktor pengenceran maka semakin rendah jumlah koloni mikroba.¹⁵ Pengenceran dilakukan secara bertingkat untuk menumbuhkan koloni bakteri secara terpisah dan akan lebih mudah untuk dihitung. Pada penelitian ini sampel dibawah 10^{-5} tidak ditanam karena kemungkinan TBUD (Terlalu Banyak Untuk Dihitung) besar.¹⁶ Berdasarkan tabel 1 hasil kuantifikasi TPC pada *batch* 1 sebesar 9×10^5 CFU/ml, pada *batch* 2 sebesar 22×10^5 CFU/ml, dan *batch* 3 sebesar $18,33 \times 10^5$ CFU/ml. Adanya perbedaan nilai antar *batch* yang terlalu jauh dikarenakan pada penelitian *pipetting* yang dilakukan kurang sempurna sehingga akan mempengaruhi tingkat homogen dari NS stok serta pengambilan bakteri untuk dimasukkan kedalam NS juga tidak bisa diukur secara akurat.

Metode perhitungan secara kualitatif bertujuan untuk mendeteksi ada atau tidaknya bakteri.¹⁴ Pada penelitian ini menggunakan metode *turbidimetri* (spektrofotometri) yang diukur menggunakan panjang gelombang (λ) 600 nm. Metode ini akan menghitung seluruh sel bakteri baik yang hidup maupun yang mati berdasarkan kekeruhan.

Semakin tinggi konsentrasi dari suatu sampel maka akan semakin tinggi nilai absorbansinya.¹⁷ Nilai absorbansi pada penelitian ini ditunjukkan oleh Tabel 1. Pada penelitian ini nilai absorbansi digunakan untuk memudahkan pengulangan.

Perbandingan *Yield* antara *Filter Based Kit* dengan *Heat Treatment* pada *S.aureus*

Filter based kit merupakan salah satu metode isolasi DNA berbasis kit menggunakan kolom spin yang didalamnya terdapat kertas filter. Adanya ion-ion positif pada spin kolom akan mengikat DNA yang diisolasi merupakan prinsip kerja dari metode ini.¹⁸ Berdasarkan Tabel 5.3 didapatkan nilai rata – rata *yield S.aureus* tertinggi pada konsentrasi 10^3 dan 10^4 CFU/ml bakteri dengan nilai 5 ± 0 ng/μl. Nilai LoD dan LoQ metode *filter based kit* sebesar 2 ng/μl. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan *yield* isolasi DNA yang terdeteksi dan terkuantifikasi menggunakan metode *filter based kit* membutuhkan minimal 10 CFU/ml. Nilai *yield* dinyatakan tinggi bila lebih dari 10 ng/μl.¹⁹ Hal ini menunjukkan bahwa hasil *yield* pada metode ini dapat dinyatakan rendah karena berkisar pada $5 \pm 1,73$ ng/μl. Rendahnya *yield* pada isolasi DNA dapat disebabkan oleh jumlah sel yang sedikit dan presipitasi DNA yang kurang maksimal sehingga menyebabkan DNA yang dihasilkan hanya sedikit.²⁰ *Buffer* yang digunakan dalam metode *filter based kit* ini kurang optimal karena tidak ada enzim proteinase K pada saat proses pelisisan. Proteinase K berfungsi untuk melisis protein, salah satu protein yang berpengaruh pada nilai *yield* adalah DNase yang merupakan suatu enzim yang dapat merusak DNA. Adanya DNase yang menyebabkan degradasi DNA, sehingga *yield* DNA yang dihasilkan rendah.²¹ Selain itu, kit *bioflux* yang dipakai menyarankan menggunakan bakteri dengan konsentrasi 10^9 - 10^{12} CFU/ml, akan tetapi penelitian ini menggunakan konsentrasi 10^1 - 10^5 CFU/ml. Hal ini akan berpengaruh terhadap *yield* yang dihasilkan menjadi rendah.

Hasil uji isolasi DNA metode *heat treatment* ditunjukkan pada tabel 5.4. Hasil *yield S.aureus* pada metode ini memiliki rata – rata tertinggi sebesar $3,67 \pm 0,57$ ng/μl pada konsentrasi bakteri 10^4 dan telah memenuhi nilai LoD pada tabel 5.4 sebesar 2,04 ng/μl akan tetapi, tidak memenuhi nilai LoQ sebesar 6,03

ng/μl. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan *yield* isolasi DNA yang terdeteksi menggunakan metode *heat treatment*. Dari tabel 5.3 dapat dinyatakan bahwa hasil *yield* pada metode ini sangat rendah karena kurang dari 10 ng/μl. Metode *heat treatment* merupakan salah satu metode sederhana yang melisiskan dinding bakteri hanya panas untuk mendapatkan sampel DNA tanpa penambahan *buffer* lisis. *Buffer* lisis memiliki kemampuan untuk merusak dinding sel bakteri, sehingga *yield* yang dihasilkan rendah karena kurang optimalnya pelisisan dinding sel bakteri. Pada penelitian ini, dilakukan pemanasan bakteri kedalam aquades dengan suhu 100°C selama 10 menit.⁹ Panas pada suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein karena pemutusan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar pada struktur sekunder dan tersier suatu protein.²⁸ Hal ini, tidak hanya akan menyebabkan rusaknya dinding sel tetapi juga dapat merusak struktur DNA bakteri *S.aureus* sehingga hasil *yield* yang dihasilkan akan memiliki nilai yang rendah. Pada uji statistik data *yield* metode *heat treatment* menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) pada konsentrasi bakteri 10^4 terhadap kontrol, konsentrasi bakteri 10^1 , 10^2 , dan 10^3 .

Perbandingan Kemurnian antara *Filter Based Kit* dengan *Heat Treatment* pada *S.aureus*

Kemurnian sampel DNA diukur pada A260/280 nm akan dinyatakan baik apabila berada pada angka 1,8 – 2,0.¹² Tabel 5.3 menunjukkan hasil kemurnian berada pada kisaran -5,0 – 5,0. Hasil kemurnian yang berada dibawah 1,8 dikarenakan adanya kontaminasi DNA dengan protein.⁸ Sedangkan, untuk kemurnian diatas 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi dengan RNA.²² Hal ini dikarenakan tidak adanya proteinase K sebagai penghancur protein salah satunya RNase, sehingga RNase akan meningkat dan menyebabkan terjadinya kontaminasi RNA pada kemurnian yang dihasilkan.²¹

Tabel 5.3 menunjukkan nilai rata-rata kemurnian yang dimiliki oleh metode *heat treatment* ini terdeteksi pada konsentrasi bakteri 10^4 dengan *range* 1,5 – 2,0. Nilai kemurnian dikatakan baik apabila berada pada angka 1,8 – 2,0, sehingga metode *heat treatment* pada konsentrasi 10^4 hasil kemurnian yang berada dibawah 1,8 dikarenakan adanya kontaminasi DNA dengan protein.⁸ Adanya kontaminasi pada protein dapat disebabkan karena pada metode *heat treatment* ini hanya dilakukan metode pelisisan dinding sel tanpa proses penghilangan komponen non-DNA dan pemurnian DNA.⁸

Perhitungan LOD dan LOQ Metode *Heat Treatment* dan Metode *Filter Based Kit*

Berdasarkan gambar 5.1 metode *filter based kit* memiliki hasil yang lebih tinggi daripada metode

heat treatment pada masing – masing konsentrasi bakteri. Analisa statistik juga menunjukkan adanya nilai signifikan. Hal ini mengindikasikan metode *filter based kit* lebih baik dari pada metode *heat treatment* karena isolasi DNA dapat dilakukan pada konsentrasi bakteri 10 CFU/ml pada metode *filter based kit* dan nilai *yield* pada konsentrasi tersebut telah melebihi nilai LoD 2 ng/μl. Sedangkan, pada metode *heat treatment* membutuhkan minimal 10.000 CFU/ml untuk dapat dilakukan isolasi bakteri dengan nilai *yield* diatas nilai LoD 2,04 ng/μl.

Metode *filter based kit* memiliki nilai LoQ yang sama dengan nilai LoDnya sebesar 2 ng/μl, sehingga metode ini dapat dilakukan isolasi DNA pada konsentrasi 10 CFU/ml karena telah melebihi nilai LoQnya. Sedangkan, pada metode *heat treatment* membutuhkan lebih dari 10.000 untuk dapat dilakukan isolasi bakteri dengan nilai *yield* diatas nilai LoQ sebesar 6,03 ng/μl.

S.aureus memiliki dinding peptidoglikan yang tebal yang berikatan dengan protein menggunakan ikatan kovalen. Selain itu, bakteri gram positif memiliki ikatan protein non-kovalen dengan asam teikoat. Berbagai perlakuan kimia pada metode *filter based kit* membantu menghancurkan struktur kompleks yang dimiliki oleh *S.aureus*.²⁹ Pelisisan bakteri pada metode filter based ini dilakukan oleh *buffer EL*, selain itu DNA dalam sampel dibebaskan oleh *RS buffer*, *GA buffer* dan *PK solution*. Setelah dinding sel bakteri lisis, pemisahan komponen non-DNA dilakukan oleh *Binding buffer*, proses yang terakhir untuk mendapatkan kemurnian DNA bakteri dilakukan elusi oleh *Elution buffer*.²⁵ Adanya proses kompleks pada metode *filter based* menghasilkan nilai *yield* yang lebih tinggi daripada metode *heat treatment*.

Metode *boiling* atau *heat treatment* dapat dijadikan alternatif pilihan dalam memilih metode isolasi DNA. Dalam melakukan metode ini membutuhkan waktu yang lebih singkat sekitar 10 – 12 menit, biaya yang diperlukan juga lebih murah, akan tetapi metode *heat treatment* memiliki hasil DNA yang lebih kasar serta konsentrasi yang dihasilkan lebih sedikit.²⁷ Hal ini disebabkan karena metode *heat treatment* hanya dilakukan pelisisan dinding sel bakteri dengan pemanasan tanpa *buffer* apapun.⁹ Selain itu, lisozim yang digunakan pada metode *filter based kit* akan membantu proses perusakan dinding bakteri yaitu dengan cara menghidrolisis lapisan peptidoglikan yang tebal pada bakteri gram positif.²⁶

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan, dapat disimpulkan :

1. LoD pada metode *filter based kit* adalah 2 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 10¹ CFU/ml dan pada metode *heat treatment* adalah 2,06 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 10⁴ CFU/ml
2. LoQ pada metode *filter based kit* adalah 2 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 10¹ CFU/ml dan pada metode *heat treatment* adalah 6,11 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum lebih dari 10⁴ CFU/ml
3. Metode *filter based kit* lebih baik daripada metode *heat treatment* berdasarkan LoD dan LoQ

SARAN

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

1. Diperlukan langkah – langkah untuk pemurnian DNA yang lebih baik
2. Diperlukan penelitian lanjutan untuk uji PCR sehingga hasil dapat dikonfirmasi lebih pasti.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada pembimbing, penguji, ikatan orangtua mahasiswa (IOM).

DAFTAR PUSTAKA

1. Hapsari, Wahyuni dan Mudjianto. 2018. Pengetahuan Petugas Surveilans tentang Identifikasi *Healthcare-Associated Infections* di Surabaya. pp. 130–138. doi: 10.20473/jbe.v6i22018.130-138
2. Thomer L. Schneewind O, dan Missiakas D. 2016. Application of Routine Diagnostic Procedure, VITEK 2 Compact, MALDI-TOF MS, dan PCR Assays in Identification Procedure of Bacterial Strain with Ambiguous Phenotype. doi: 10.1007/s00284-016-0993-0.
3. Polat G., Ugan R, Cardirci E, dan Halici Z. 2017. Sepsis dan Septic Shock: Current Treatment Strategies dan New Approaches Sepsis ve Septik Şok: Mevcut Tedavi Stratejileri ve Yeni Yaklaşımlar., pp. 53–58. doi: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062.
4. Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Takeshita M, Kirimura Y, et al. 2018. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *PLoS ONE* 13(8):e0202049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202049>
5. Ling, D. I. Flores, L. Riley, L. W., Pai, M. 2008. ‘Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis dan Meta-Regression’, (2). doi:10.1371/journal.pone.0001536.
6. Shi, R., Lewis, R. S. dan Panthee, D. R. (2018) ‘Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification’, pp. 1–14.
7. Septi Kurniama Sari, Muthia Naila Mazieda, Dwi Listyorini, dan E. S. S. (2014). Optimization Of Dna Isolation And Purification Technique From Chili Pepper (Capsicum Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya. *Pendidikan Biologi FKIP UNS*, 11(1), 65–70.
8. Dilhari, A., Sampath, A., Gunasekara, C., Fernando, N., Weerasekera, D., Sissons, C., McBain, A., & Weerasekera, M. (2017). 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*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0477-z>
9. Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117–122.
10. Sunarno, Muna, F., Fitri, N., Malik, A., Karuniawati, A., dan Soebdanrio, A. 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae*. 42(2), pp. 85–92.
11. Jawetz, Melnick & Adelberg. 2013. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 25. Jakarta : Salemba Medika
12. Armbruster, D. A. dan Pry, T. 2008. ‘Limit of Blank, Limit of Detection dan Limit of Quantitation’, 29(August), pp. 49–52.
13. Torowati, & Galuh, B. S. (2014). Penentuan Nilai Limit Deteksi Dan Kuantisasi. *Jurnal Batan*, 13, 9–15. <http://jurnal.batan.go.id/index.php/pin/article/view/1371/1302>
14. Darmansah, I. (2011). *Penilaian Kualitas Susu Sapi Berdasarkan Jumlah Total Mikroorganisme, Escherichia coli dan Staphylococcus aureus di Kabupaten Bogor, Cianjur, Bandung, Sumedang, dan Tasikmalaya, Provinsi Jawa Barat*.

15. Sukmawati, S., & Hardianti, F. (2018). Analisis Total Plate Count (TPC) Mikroba pada Ikan Asin Kakap di Kota Sorong Papua Barat. *Jurnal Biodjati*, 3(1), 72. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v3i1.2368>
16. Putri, A. M., & Kurnia, P. (2018). Identifikasi Keberadaan Bakteri Coliform Dan Total Mikroba Dalam Es Dung-Dung Di Sekitar Kampus Universitas Muhammadiyah Surakarta. *Media Gizi Indonesia*, 13(1), 41. <https://doi.org/10.20473/mgi.v13i1.41-48>
17. Lizayana, Mudatsir, dan Iswadi. 2016. Densitas Bakteri Pada Limbah Cair Pasar. Universitas Syiah Kuala. Aceh.
18. Tan, S. C. dan Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, dan Protein Extraction: The Past dan The Present. School of Postgraduate Studies & Research, Division of Pharmacy, International Medical University. doi: 10.1155/2009/574398
19. Siswanto, J. E., Berlian,T., Putricahya,E., Panggalo, L. V, & Yuniani, L. (2016). Isolasi DNA pada Sampel Darah Tepi dan Swab Buccal pada Bayi Penderita ROP: Perbandingan Hasil Uji Konsentrasi dan Indeks Kemurnian. 18(4).
20. Sari S. K., Mazieda M. N., Listyorini, D., dan Sulasmi, E. S. 2015. Optimization Of Dna Isolation Dan Purification Technique From Chili Pepper (Capsicum) Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS Biologi , Sains , Lingkungan , dan Pembelajarannya _', pp. 65–70.
21. Fitriya, R.T., Ibrahim,M., & Lisdiana,L. (2015). Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *LenteraBio*, 4(1), 87–92.
22. Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., & Ravichandran, M. (2013). Comparative evaluation of three different methods of genomic dna extraction for *Staphylococcus aureus*. *World Applied Sciences Journal*, 21(3),424–427. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.21.3.2850>
23. Merk,S., Neubauer, H., Meyer, H., & Greiser-Wilke, I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste.
24. Abdel-Latif,A., & Osman,G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
25. AACL Bioflux, 2016, Volume 9, Issue 2. <http://www.bioflux.com.ro/aac> diakses pada 27 april 2020
26. Shahriar,M.,Md. Rashidul H., Shaila K., Irin D & Mohiuddin A.B. 2011. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(1), 53-57.
27. Bagus, I., Adiguna, G., Darwinata, A. E., Nengah, N., & Fatmawati, D. (2017). *Rapid Detection Of Methicillin Resistant Staphylococci Using Multiplex PCR With Boiling Method For DNA Isolation*. 1(2), 8–10.
28. Novia, D., Melia, S., & Ayuza, N. Z. 2011. Kajian suhu pengovenan terhadap kadar protein dan nilai organoleptik telur asin. *Jurnal Peternakan*, 8(2), 70–76.
29. Charpaval, L., Gomes, J.E., Duarte, F.R., Tsai, S.M., dan Moon, D.H. 2008. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *General Dentistry*, 59(1), 299–306.