

PERBANDINGAN KUANTITAS DAN KUALITAS DNA *Escherichia coli* HASIL EKSTRAKSI MENGGUNAKAN KIT KOMERSIAL BERBASIS FILTER DENGAN METODE ALKALINE LYSIS

Rodemoza Z. Z. G. D. R. Renaning, Muhammad Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Penegakan diagnosis sepsis yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* membutuhkan waktu yang cepat dan hasil yang akurat untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas metode diagnosis. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode diagnosis yang cepat dan sensitif yang dapat digunakan dan memerlukan metode ekstraksi DNA. Metode ekstraksi DNA *Filter Based Kit* yang sering digunakan bersifat *single use* dan memerlukan biaya yang mahal. *Alkaline Lysis* adalah penyederhanaan metode ekstraksi DNA, namun metode ini belum diketahui dapat menghasilkan kuantitas dan kualitas ekstrak DNA yang lebih tinggi dan lebih baik daripada *Filter Based Kit*. Penelitian ini akan membandingkan hasil ekstraksi DNA dari metode ekstraksi DNA *Filter Based Kit* (FBK) dengan *Alkaline Lysis* (AL) berdasarkan kuantitas DNA (*yield*) dan kualitas DNA (*purity*).

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* dengan membandingkan hasil ekstraksi DNA menggunakan metode FBK dengan AL pada konsentrasi *E. coli* sebesar 10^8 dan 10^{12} CFU/ml dan dengan kontrol *Normal Saline* tanpa bakteri. Pengukuran kuantitas dan kualitas dilakukan menggunakan Spektrofotometer NanoDrop pada $\lambda=260$ nm dan 280 nm. Analisa data statistik dilakukan menggunakan metode uji ANOVA dan uji *post hoc* dengan LSD.

Hasil: Hasil kuantitas DNA di konsentrasi 10^{12} CFU/ml pada metode FBK adalah $57,60 \pm 21,96$ $\mu\text{g/ml}$, sedangkan pada metode AL sebesar $18,40 \pm 1,14$ $\mu\text{g/ml}$. Pada konsentrasi 10^{12} CFU/ml, hasil kemurnian DNA dari kedua metode memiliki nilai rasio absorbansi 1,6-2,0. Hasil kuantitas DNA pada 10^8 CFU/ml metode FBK adalah $19,40 \pm 1,67$ $\mu\text{g/ml}$ sedangkan pada AL sebesar $7,40 \pm 1,52$ $\mu\text{g/ml}$, namun hasil kemurnian DNA pada metode AL didapatkan $>2,0$ dan pada FBK sebesar 1,9. Pada kontrol, kuantitas DNA yang didapatkan $<0,2$ $\mu\text{g/ml}$ dengan kemurnian DNA yang tidak terdeteksi.

Kesimpulan: Metode FBK menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang lebih baik daripada AL.

Kata Kunci: Ekstraksi DNA, *filter based kit*, *alkaline lysis*, *Escherichia coli*

*Korespondensi:

Rio Risandiansyah, S.Ked, MP., PhD,
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144
+62-341-578920
e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

THE QUANTITY AND QUALITY COMPARISON OF *Escherichia coli* DNA EXTRACTION USING FILTER-BASED COMMERCIAL KIT WITH ALKALINE LYSIS METHOD

Rodemoza Z. Z. G. D. R. Renaning, Muhammad Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Diagnosis of sepsis caused by *Escherichia coli* has to be done quickly and accurately to increase the sensitivity and specificity of diagnostic method. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a rapid and sensitive diagnostic method that can be used and requires a DNA extraction method. Filter-based kit (FBK) DNA extraction method that is commonly used but it is a single use and quite expensive. Alkaline lysis (AL) is a simplification of the DNA extraction method, but this is not yet known to produce higher quantity and better quality of DNA extract compared to FBK. This study will compare the results of DNA extraction from FBK extraction method with AL based on the quantity of DNA (*yield*) and the quality of DNA (*purity*).

Method: This research was an *in vitro* study that compared the products of DNA extraction using FBK and AL methods at two different concentrations of *E. coli* (10^8 and 10^{12} CFU/ml). Each group was compared with control, *normal saline* without bacteria. We measured the quantity and quality using NanoDrop Spectrophotometer at $\lambda=260$ nm and 280 nm. The data was analyzed using ANOVA and continued with LSD post hoc test. It considered significant if *p* less than 0.05.

Results: The quantity of DNA at concentration of 10^{12} CFU/ml in the FBK method was 57.60 ± 21.96 $\mu\text{g/ml}$, while in the AL method it was 18.40 ± 1.14 $\mu\text{g/ml}$. At concentration of 10^{12} CFU/ml, the results of DNA purity from both methods had an absorbance ratio of 1.6-2.0. The results of the quantity of DNA at 10^8 CFU/ml FBK method was 19.40 ± 1.67 $\mu\text{g/ml}$ while in AL it was 7.40 ± 1.52 $\mu\text{g/ml}$, but the results of DNA purity in the AL method was more than 2.0 (pure DNA value was at 1.6-2.0) and in FBK method was at 1.9. The quantity of DNA in control group was less than 0.2 $\mu\text{g/ml}$ with undetectable DNA purity.

Conclusion: The FBK produced DNA with better quantity and quality than AL method.

Keywords: DNA extraction, filter-based kit, alkaline lysis, *Escherichia coli*

*Corresponding author:

Rio Risandiansyah, S.Ked, MP., PhD,

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

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

+62-341-578920

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Bakteri *E. coli* dapat ditemukan pada tubuh manusia sebagai normal flora namun *E. coli* juga dapat menyebabkan kejadian infeksi saluran kemih yang cukup tinggi di Indonesia yaitu 180.000 kasus setiap tahun¹⁻³. Infeksi saluran kemih juga dapat menyebabkan sepsis yang menjadi penyebab 30% kematian pasien di rumah sakit setiap tahun^{4,5}. Tingkat urgensi sepsis yang tinggi ini membutuhkan penegakan diagnosis dengan waktu yang cepat dan akurat, namun sensitivitas dan spesifisitas metode diagnosis sepsis saat ini masih rendah^{6,7}.

Metode diagnosis infeksi saat ini menggunakan kultur bakteri, pewarnaan gram serta uji biokimiawi seringkali lebih sulit dan membutuhkan waktu yang lama jika dibandingkan dengan teknik molekuler⁸⁻¹⁰. Saat ini penggunaan teknik molekuler didasarkan pada teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang mampu mendeteksi patogen mikroba spesimen klinis dengan cepat dan sensitif^{11,12}. Oleh karena itu, ekstraksi DNA merupakan langkah penting dalam akurasi penggunaan PCR untuk menghasilkan DNA yang murni dan berkuantitas tinggi¹³.

Metode standar yang digunakan untuk mengekstraksi DNA saat ini yaitu kit komersial berbasis filter/FBK yang memiliki kemudahan dalam penggunaannya serta hasil perolehan konsentrasi DNA dan kemurnian yang tinggi^{14,15}. Namun, kolom *spin* komersial hanya dapat digunakan sekali (*single use*), bahan yang digunakan sulit didapatkan dan biaya yang dibutuhkan sangat mahal¹⁵. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode ekstraksi DNA yang sederhana yaitu metode AL. Pada metode AL, ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan basa sederhana¹⁶.

Penelitian ini akan membandingkan kualitas dan kuantitas ekstraksi DNA bakteri *E. coli* menggunakan metode ekstraksi DNA FBK dengan metode sederhana yaitu AL. Konsentrasi yang digunakan untuk deteksi bakteri *E. coli* yaitu 10^8 dan 10^{12} CFU/ml yang digunakan pada uji diagnostik klinis sepsis^{17,18}. Hasil ekstraksi DNA yang didapatkan akan didasarkan pada nilai kemurnian sebagai parameter kualitas DNA dan nilai *yield* sebagai parameter kuantitas DNA¹⁹.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vitro* yang dilakukan di Laboratorium Pusat

Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Mei-Juni 2021.

Inokulasi Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* kami dapatkan dari media padat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran UNISMA. Bakteri *E. coli* ditumbuhkan langsung pada cawan petri berisi *Eosin Methylene Blue Agar* Merck Millipore® yang komposisinya terdiri dari *peptones* 10 gr/L, *di-potassium hydrogen phosphate* 2 gr/L, *lactose* 5 gr/L, *sucrose* 5 gr/L, *eosin Y*, *yellowish* 0,4 gr/L, *methylene blue* 0,07 gr/L dan agar 13,5 gr/L²⁰.

Kuantifikasi Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* pada EMBA diambil menggunakan *oshe* lalu diencerkan menggunakan *Lactose Broth* Merck Millipore® (komposisi: *peptone* 5 gr/L, *meat (beef) extract* 3 gr/L, *lactose* 5 gr/L). Selanjutnya di-*vortex* hingga menjadi suspensi. Setelah itu, suspensi bakteri dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* dengan cara mengambil 1 ml suspensi kemudian diencerkan dengan 9 ml *Lactose Broth* sehingga konsentrasinya menjadi 10^{-1} . Ulangi langkah ini hingga konsentrasi menjadi 10^{-12} . Selanjutnya dari masing-masing konsentrasi diambil 100 μ l dan ditumbuhkan pada cawan petri berisi *Nutrient Agar* Merck Millipore® (komposisi: agar 15 gr/L, *meat extract* 1 gr/L, *peptone* 5 gr/L, *sodium chloride* 5 gr/L, *yeast extract* 2 gr/L) dengan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C lalu hitung total koloninya. Koloni dapat dihitung apabila berjumlah 30-300 koloni²¹.

Persiapan Sampel Bakteri

Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang telah dihitung dengan metode TPC diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan dengan 9 ml *Normal Saline*. Ulangi pengenceran ini hingga didapatkan konsentrasi sebesar 10^{12} CFU/ml, 10^8 CFU/ml, dan kontrol (hanya menggunakan 10 ml *Normal Saline*).

Ekstraksi DNA menggunakan Metode Filter Based Kit

Sampel bakteri *Escherichia coli* sebanyak 1 ml disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit kemudian ditambahkan 150 μ l *Wizard® SV Lysis Buffer* ke dalam tabung dan dicampur menggunakan pipet. *Lysate* yang terbentuk dipindahkan ke *Wizard® SV Minicolumn Assembly* dan disentrifugasi 13.000 x g selama 3 menit. Setelah itu, *minicolumn* dilepas dari

Assembly untuk membuang cairan yang terbentuk di *Collection Tube* kemudian *minicolumn* dipasang kembali ke *Collection Tube*. Pada *assembly* ditambahkan 650 μ l *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. Setelah membuang cairan pada *Collection Tube*, *minicolumn* dipasang kembali dan disentrifugasi 13.000 x g selama 2 menit untuk mengeringkan *matrix*. *Wizard[®] SV Minicolumn* dipindah ke *microtube* 1,5 ml yang baru kemudian ditambahkan 250 μ l *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 250 μ l. Terakhir, *minicolumn* dilepas dari *microtube*²².

Ekstraksi DNA menggunakan Metode *Alkaline Lysis*

Sampel bakteri *Escherichia coli* sebanyak 1 ml dipindahkan ke dalam *microtube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang, kemudian disentrifugasi kembali hingga didapatkan *pellet* yang kering. *Pellet* ditambahkan 150 μ l *resuspension buffer* (50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, *de-ion water*) kemudian di-*vortex*. Selanjutnya ditambahkan 200 μ l *lysis solution* (0,2 N NaOH, 1% SDS, *de-ion water*) lalu dikocok 6 kali sampai tercampur. Kemudian ditambahkan 300 μ l *neutralization solution* (5 M *potassium acetate*, *glacial acetic acid*, *de-ion water*) lalu dikocok 6 kali. Setelah itu, disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit kemudian *supernatant* diambil dan dipindahkan ke *microtube* baru sebanyak 300 μ l. Lalu ditambahkan 300 μ l isopropanol dan dikocok 2 kali. Selanjutnya diinkubasi pada -20°C selama 30 menit dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. Kemudian *supernatant* dibuang dan ditambahkan 600 μ l *ethanol* 70% lalu disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. *Supernatant* dibuang dan *pellet* dikeringkan dengan oven selama 30 menit dan dilarutkan dalam 50 μ l TE²³.

Pengukuran Kuantitas dan Kemurnian

DNA yang dihasilkan dari masing-masing metode ekstraksi FBK dan AL diukur menggunakan spektrofotometer NanoDrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm^{13,24}. Perhitungan hasil kuantitas DNA didasarkan pada rumus (konsentrasi DNA x total volume sampel), sedangkan hasil kemurnian DNA berkualitas baik apabila nilai absorbansinya berambang 1,6-2,0^{13,25}.

Analisa Statistik

Hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk data kuantitatif dan analisa data menggunakan metode uji *One Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan membandingkan setiap konsentrasi dari hasil penelitian. Hasil signifikan apabila $p < 0,05$ dan dilanjutkan *poc host test* yaitu uji *Least Significance Different* (LSD) untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan. Analisa

statistik dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) version 22.0.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Kuantifikasi Bakteri

Hasil kuantifikasi bakteri *E. coli* menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) yang dilakukan dengan menumbuhkan masing-masing pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-12} pada cawan petri berisi *Nutrient Agar*. Koloni yang terbentuk selama 24 jam kemudian dihitung menggunakan *colony counter*. Pada pengenceran 10^{-10} didapatkan jumlah bakteri $2,44 \times 10^{12}$. Perhitungan ini kemudian dilanjutkan secara *indirect* dengan menggunakan Spektrofotometer Epoch pada $\lambda=600$ nm. Hasil absorbansi pada pengenceran 10^{-10} diperoleh sebesar 0,073 nm. Perhitungan spektrofotometri ini dilakukan untuk mengonfirmasi stok bakteri apabila dilakukan penambahan stok atau pengulangan TPC.

Hasil Perbandingan Kuantitas DNA antara *Filter Based Kit* dengan *Alkaline Lysis*

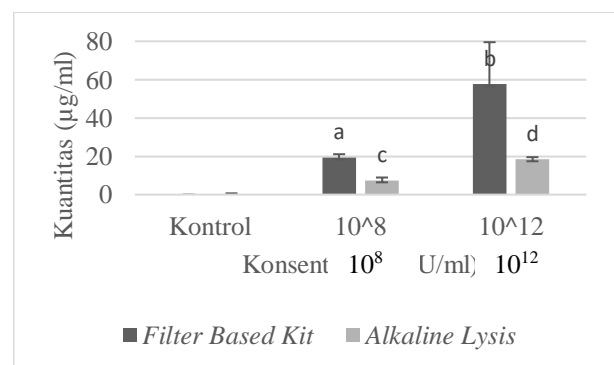
Hasil kuantitas metode FBK dan AL dapat dilihat pada **Tabel 1** sedangkan perbandingan hasil kuantitas kedua metode tersebut digambarkan pada **Gambar 1**.

Tabel 1. Hasil Kuantitas DNA Metode FBK dan AL pada *E. coli*

Konsentrasi (CFU/ml)	Kuantitas (μ g/ml)	
	<i>Filter Based Kit</i>	<i>Alkaline Lysis</i>
Kontrol	0	0,20 \pm 0,45
10^8	19,40 \pm 1,67 ^a	7,40 \pm 1,52 ^c
10^{12}	57,60 \pm 21,96 ^b	18,40 \pm 1,14 ^d

Keterangan: Data kuantitas dinyatakan dalam rata-rata \pm SD; a=berbeda signifikan terhadap b, c, d; b=berbeda signifikan terhadap a, c, d; c=berbeda signifikan terhadap a, b, d; d=berbeda signifikan terhadap a, b, c

Hasil kuantitas tertinggi metode FBK dan AL didapatkan pada konsentrasi yang sama yaitu 10^{12} CFU/ml. Namun, pada **Gambar 1** kuantitas metode FBK lebih tinggi dari kuantitas metode AL. Uji statistik perbandingan metode FBK dan AL berbeda signifikan ($p < 0,00$) pada antar metode. Uji *post hoc* LSD menunjukkan



Gambar 1. Perbandingan Kuantitas Metode FBK dan AL

Keterangan: Data kuantitas dinyatakan dalam rata-rata \pm SD; Perbedaan notasi huruf menunjukkan berbeda signifikan

berbeda signifikan ($p < 0,05$) antara metode FBK dengan AL.

Uji statistik yang dilakukan pada metode FBK dan AL juga berbeda signifikan ($p = 0,00$) antara masing-masing konsentrasi. Uji *post hoc* LSD pada konsentrasi 10^8 CFU/ml berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap 10^{12} CFU/ml. Pada konsentrasi 10^{12} CFU/ml berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap 10^8 CFU/ml.

Hasil Perbandingan Kualitas DNA antara *Filter Based Kit* dengan *Alkaline Lysis*

Hasil kemurnian metode FBK dan AL dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Kemurnian DNA Metode FBK dan AL pada *E. coli*

Konsentrasi (CFU/ml)	Kemurnian (A_{260}/A_{280})	
	<i>Filter Based Kit</i>	<i>Alkaline Lysis</i>
Kontrol	0	n.d.
10^8	$1,91 \pm 0,16$	$2,22 \pm 0,22$
10^{12}	$1,85 \pm 0,15$	$1,92 \pm 0,08$

Keterangan: Data kemurnian dinyatakan dalam rata-rata \pm SD; n.d. = *not detected*

Nilai kemurnian metode FBK pada kontrol didapatkan hasil 0, pada konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml masing-masing didapatkan rata-rata kemurnian 1,91 dan 1,85. Sedangkan pada metode AL nilai kemurnian tidak dapat terdeteksi pada kontrol, namun dapat terdeteksi pada konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml dengan rata-rata 2,22 dan 1,92. Nilai kemurnian dikatakan baik apabila berambang pada 1,6-2,0, maka hasil kemurnian metode AL pada kontrol dan 10^8 CFU/ml kurang baik.

PEMBAHASAN

Kuantifikasi Bakteri

Kuantifikasi bakteri *E. coli* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Perhitungan dengan metode TPC ini bertujuan untuk mengetahui jumlah bakteri yang *viable* dalam stok dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang ditumbuhkan dalam media agar^{21,26}. Koloni yang tumbuh pada media agar dapat dilihat langsung (*direct*) dengan mata telanjang tanpa menggunakan mikroskop sehingga pada proses perhitungannya menggunakan *colony counter*²¹. Kelebihan dari *direct counting* ini hanya dapat menghitung bakteri yang *viable*/hidup yang memang dibutuhkan untuk keperluan diagnosis^{27,28}. Metode perhitungan TPC ini diawali dengan melakukan pengenceran bertingkat untuk memperkecil jumlah bakteri yang terdapat dalam stok sehingga jumlah koloni sesuai dengan standar perhitungan analisis TPC yaitu 30-300 CFU/ml^{21,29}. Prinsip kerja pengenceran bertingkat ini yaitu menghomogenkan sampel dengan kelipatan 10 menggunakan perbandingan 1:9 untuk sampel dan pengenceran selanjutnya sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel bakteri dari pengenceran sebelumnya^{21,27}. Pada penelitian ini jumlah

koloni yang sesuai dengan standar perhitungan analisis TPC ditemukan pada faktor pengenceran 10^{-10} yang berjumlah 244 CFU/ml.

Pengaruh Jumlah Sel terhadap Kuantitas dan Kualitas Ekstraksi DNA

Jumlah sel yang disarankan pada penggunaan FBK (Wizard® SV Genomic DNA Purification System) adalah sebesar 1×10^4 CFU/ml hingga 5×10^6 CFU/ml²². Sedangkan *infective dose E. coli* yaitu diatas 10^6 CFU/ml³⁰. Pada kasus sepsis konsentrasinya mencapai 10^8 sampai 10^{12} CFU/ml¹⁷. Jumlah sel yang digunakan pada penelitian ini adalah 10^8 dan 10^{12} CFU/ml dengan menggunakan kontrol tanpa bakteri (0 CFU/ml). Pada hasil penelitian didapatkan hasil kuantitas DNA tertinggi pada konsentrasi 10^{12} CFU/ml kemudian hasil kuantitasnya menurun pada konsentrasi 10^8 CFU/ml pada kedua metode. Hal tersebut dikarenakan kuantitas hasil ekstraksi DNA dapat dipengaruhi oleh jumlah sel pada sampel³¹. Dalam hal ini, semakin tinggi konsentrasi/jumlah sel maka semakin tinggi DNA yang dapat diekstraksi.

Hasil kemurnian DNA kedua metode tersebut pada konsentrasi 10^{12} CFU/ml lebih murni daripada konsentrasi 10^8 CFU/ml. Hal ini dimungkinkan oleh faktor proses fiksasi antara sel-sel dengan *buffer* yang digunakan pada metode ekstraksi DNA³². Secara kualitatif, *buffer* tersebut harus dapat mempertahankan kualitas DNA saat proses ekstraksi DNA³³. Namun, apabila semakin sedikit jumlah sel kemungkinan akan terjadi sedikit proses fiksasi sehingga kontaminan terhadap *buffer* semakin tinggi dan hasil kemurnian DNA menjadi kurang baik pada jumlah sel yang rendah. Akan tetapi, faktor utama yang paling berpengaruh terhadap kemurnian DNA adalah jenis bahan kimia yang digunakan pada metode ekstraksi DNA, konsentrasi bahan kimia serta teknik perlakuan pada metode ekstraksi^{33,34}. Sehingga jumlah sel tidak berpengaruh signifikan terhadap kualitas hasil ekstraksi DNA.

Pengaruh Metode Ekstraksi DNA *Filter Based Kit* dan *Alkaline Lysis* terhadap Kuantitas dan Kualitas DNA

Parameter keberhasilan metode ekstraksi DNA didasarkan pada hasil kuantitas dan kualitas DNA yang baik³⁵. Kuantitas DNA dapat dikatakan baik apabila jumlah DNA tersebut cukup untuk digunakan dalam tahapan selanjutnya atau uji lanjutan³³. Pada penelitian ini hasil ekstraksi DNA dilakukan untuk uji lanjutan PCR yang membutuhkan kuantitas DNA sebesar $20 \mu\text{g/ml}$ ³⁶. Maka, berdasarkan hasil penelitian ini metode FBK dapat menghasilkan kuantitas DNA yang baik sedangkan AL tidak mampu menghasilkan kuantitas DNA yang baik.

Ekstraksi DNA dengan metode FBK atau kit komersial berbasis filter merupakan ekstraksi DNA yang menggunakan alat komersial berbasis kolom spin dan pelat filter serta sistem silika paramagnetik otomatis^{37,38}. Rata-rata kuantitas yang dihasilkan pada metode FBK tinggi yaitu sebesar $19,40 \mu\text{g/ml}$ dan $57,60 \mu\text{g/ml}$ pada konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{12} CFU/ml. Hal ini dipengaruhi oleh adanya mekanisme ikatan antara

partikel silika pada pelat filter yang bermuatan positif dengan DNA yang bermuatan negatif selama proses sentrifugasi^{37,39}. Partikel silika terikat dengan DNA melalui interaksi pengikatan hidrogen dengan matriks hidrofilik silika yang mengandung *chaotropic salts*^{40,41}. Garam *chaotropic* ini dapat menghancurkan sel dan menonaktifkan nuklease kemudian memungkinkan silika mengikat DNA³⁸. Maka dari proses tersebut metode FBK dapat menghasilkan kuantitas DNA yang tinggi¹⁵.

Pada metode AL, proses ekstraksi DNA dilakukan dengan cara melisis sel menggunakan basa sederhana¹⁶. Pelisisan ini didasarkan pada komponen utama ion OH⁻ yang dapat memutuskan ikatan ester asam lemak dan gliserol sehingga membran sel dapat ditembus⁴². Pada metode ini didapatkan rata-rata hasil kuantitas sebesar 0,20 µg/ml pada kontrol, 7,40 µg/ml pada 10⁸ CFU/ml, 18,40 µg/ml pada 10¹² CFU/ml yang kuantitasnya lebih rendah dibandingkan metode FBK. Berbeda dengan metode FBK yang menggunakan pelat filter berisi partikel silika yang mampu mengikat DNA dengan baik, metode AL tidak terdapat partikel silika yang dapat menahan DNA. Rendahnya hasil kuantitas DNA pada metode AL juga dapat disebabkan adanya tahapan pengocokan DNA terlalu kuat sehingga terjadi proses penggerusan yang dapat merusak DNA dan dapat menghilangkan sebagian besar DNA⁴³. Hal ini menjadikan hasil kuantitas metode AL menjadi lebih rendah dibandingkan metode FBK.

Hasil kemurnian DNA pada kedua metode dikatakan baik apabila dalam rentang 1,6-2,0²⁵. Pada penelitian ini didapatkan bahwa hasil kemurnian metode FBK sama dengan metode AL pada konsentrasi 10¹² CFU/ml, namun pada konsentrasi 10⁸ CFU/ml kemurnian FBK lebih baik daripada AL. Metode FBK dapat menghasilkan kualitas DNA yang murni pada konsentrasi 10⁸ dan 10¹² CFU/ml disebabkan oleh pengikatan partikel silika pada pelat filter yang mengikat DNA dengan erat serta larutan *buffer* yang terdapat pada kit akan menghilangkan semua kontaminan melewati membran filter selama proses ekstraksi⁴⁴. Larutan *buffer* tersebut dapat menghilangkan protein, lipopolisakarida dan RNA untuk meningkatkan kemurnian dengan tetap menjaga DNA terikat pada silika³⁸. Proses-proses ini dapat memudahkan pengikatan, pencucian dan elusi DNA sehingga didapatkan kualitas DNA yang murni^{15,45}.

Pada metode AL, hasil kemurnian memiliki rentang 1,6-2,0 pada konsentrasi 10¹² CFU/ml namun pada konsentrasi yang lebih rendah 10⁸ CFU/ml serta kontrol kemurniannya menjadi tidak terdeteksi dan melebihi 2,0 yang berarti DNA terkontaminasi oleh RNA⁴⁶. Hal ini dikarenakan selama lisis basa terbentuk endapan yang mengandung protein denaturasi dan asam nukleat seperti RNA⁴². Setelah dilakukan proses sentrifugasi, DNA dan RNA akan tercampur dan berada dipermukaan sedangkan komponen seluler akan mengendap sehingga perlu keterampilan agar hanya ekstrak DNA yang dapat diambil⁴⁷. Pada tahapan pengeringan DNA yang tidak maksimal saat proses purifikasi juga dapat menurunkan nilai kemurnian DNA sehingga larutan purifikasi seperti alkohol/etanol dapat mengganggu hasil pembacaan spektrofotometer. Pada penelitian yang dilakukan oleh

Yahya (2017) metode AL dapat dimodifikasi dengan penambahan perlakuan panas, perlakuan fisik (panas) yang diberikan ternyata dapat meningkatkan efisiensi pemaparan molekul lipid ke larutan alkali sehingga dapat menghilangkan kontaminan ekstrak DNA^{16,48}. Namun, pada metode AL penelitian ini tidak terdapat tahapan perlakuan panas tersebut. Sehingga penelitian lanjutan dengan modifikasi pemanasan pada metode AL, khususnya untuk ekstraksi DNA dapat dilakukan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa statistik dan studi literatur dapat disimpulkan bahwa:

1. Kuantitas ekstrak DNA *Escherichia coli* menggunakan FBK lebih tinggi dibandingkan metode AL.
2. Kualitas ekstrak DNA *Escherichia coli* murni pada FBK di semua konsentrasi dan AL hanya pada konsentrasi 10¹² CFU/ml yang memiliki nilai kemurnian dalam rentang 1,6-2,0. Sedangkan pada AL konsentrasi 10⁸ CFU/ml nilai kemurnian lebih dari 2,0.

SARAN

Adapun beberapa saran untuk meningkatkan penelitian ini di masa mendatang yaitu:

1. Melakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk menilai keberhasilan metode ekstraksi DNA secara aplikatif.
2. Melakukan modifikasi metode AL dengan menggunakan langkah-langkah yang dapat meminimalkan terjadinya kerusakan DNA dan memaksimalkan kemurnian DNA.
3. Menggunakan konsentrasi minimal 10¹² CFU/ml pada metode ekstraksi DNA AL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana serta tim kelompok penelitian yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*. 2015;4:1–12.
2. Darsono P V., Mahadiyah D, Fahrianti F. Gambaran karakteristik ibu hamil yang mengalami infeksi saluran kemih (ISK) di wilayah kerja Puskesmas Pekauman Banjarmasin. *Din Kesehat*. 2016;7(1):162–70.
3. Departemen Kesehatan RI. Survei demografi dan kesehatan Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2014.
4. Gauer R. Early recognition and management of sepsis in adults: the first six hour. *Am Fam Physician*. 2013;88(1):44–53.
5. World Health Organization. Kesehatan Reproduksi Wanita Infeksi Saluran kemih (ISK). Jakarta: Salemba Medika; 2013.
6. Herlina, Mayetti, Yetti H. Uji Diagnostik CD64

- Netrofil untuk Sepsis pada Anak dengan Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Sari Pediatri*. 2018;20(2):79–84.
7. Runtuuwu AL, Manoppo JIC, Rampengan TH, Rampengan NH, Kosim S. Efektivitas Pemeriksaan Prokalsitonin sebagai Petanda Dini Sepsis pada Anak. *Sari Pediatri*. 2008;9(5):319–22.
 8. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):208–36.
 9. 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(130):1–32.
 10. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. StatPearls Publishing; 2020.
 11. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*. 2017;8(108):1–9.
 12. Karim Kadri. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. IntechOpen; 2019. 1–17 p.
 13. Promega Corporation. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
 14. Poh J, Gan S. The Determination of Factors involved in Column-Based Nucleic Acid Extraction and Purification. *J Bioprocess Biotech*. 2014;4(3):1–5.
 15. 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.
 16. 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.
 17. König C, Simmen HP, Blaser J. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid - Implications for bactericidal activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(2):227–32.
 18. Hay AD, Birnie K, Busby J, Delaney B, Downing H, Dudley J, et al. The Diagnosis of Urinary Tract infection in Young children (DUTY): A diagnostic prospective observational study to derive and validate a clinical algorithm for the diagnosis of urinary tract infection in children presenting to primary care with an acute i. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2016;20(51):1–197.
 19. Syafaruddin, Randriani E, Santoso TJ. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Jambu Mete. *J Ristri*. 2011;2(2):151–60.
 20. Yusmaniar, Wardiyah, Nida K. Mikrobiologi dan Parasitologi. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017. 32 p.
 21. Yunita M, Hendrawan Y, Yulianingsih R. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (Aerofood ACS) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) Dengan Metode Pour Plate. *J Keteknikan Pertanian Trop dan Biosist*. 2015;3(3):237–48.
 22. Promega Corporation. Wizard® SV Genomic DNA Purification System Quick Protocol [Internet]. USA: Promega; 2012. 4 p. Available from: [papers2://publication/uuid/96B2F682-0A28-4CDC-83AA-E7B8B5B58DAD](https://www.promega.com/resources/papers2/publication/uuid/96B2F682-0A28-4CDC-83AA-E7B8B5B58DAD)
 23. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 24. Gosiewski T, Szała L, Pietrzyk A, Brzywczy-Włoch M, Heczko PB, Bulanda M. Comparison of Methods for Isolation of Bacterial and Fungal DNA from Human Blood. *Curr Microbiol*. 2014;68(2):149–55.
 25. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci*. 2014;6(2):81–85.
 26. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. 8th Revisi. Washington DC: Office of Special Research Skills, Center for Food Safety and Applied Nutrition; 1998.
 27. Badan Standardisasi Nasional. Cara Uji Cemar Mikroba. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional; 1992.
 28. Kumar SS, Ghosh AR. Assessment of bacterial viability: A comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology*. 2019;165(6):593–610.
 29. Sukmawati, Hardianti F. Analisis Total Plate Count (TPC) Mikroba pada Ikan Asin Kakap di Kota Sorong Papua Barat. *J Biodjati*. 2018;3(1):72–8.
 30. Lonigro A, Catalano M, Rubino P. Agricultural use of treated municipal wastewaters preserving environmental sustainability. *Ital J Agron*. 2007;2(2):217–59.
 31. Putri NPPE, Junitha IK. Kualitas dan Kuantitas DNA Darah Kering pada Besi dan Kayu yang Disimpan dalam Kurun Waktu Berbeda. *J Biol*. 2015;19(1):21–4.
 32. Hafy Z, Larasati V, Puspita RS, S N, M H, A R, et al. Hubungan Lama Penyimpanan Sampel Arsip Jaringan dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin dengan Kualitas Hasil Ekstraksi DNA Mitokondria Jaringan. *Sriwij J Med*. 2018;1(3):158–63.

33. Marwayana ON. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *Oseana*. 2015;15(2):1–9.
34. Ernawati A. Optimasi Metode Isolasi DNA *Annona muricata* Linn. dengan Uji Kualitatif dan Kuantitatif. Universitas Airlangga; 2009.
35. Phillips K, McCallum N, Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA investigator kit (manual and automated). *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(2):282–5.
36. European Molecular Biology Laboratory. Protein Expression and Purification Core Facility [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 3]. Available from: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/pcr_strategy/optimising_pcr/#:~:text=The success or failure of PCR depends on,of mispriming%2C which results in nonspecific PCR products.
37. GC biotech. Nucleic Acid Isolation [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 20]. Available from: <https://gcbiotech.com/products-by-applications/nucleic-acid-isolation/>
38. Promega Corporation. DNA Purification [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>
39. Esser KH, Marx WH, Lisowsky T. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods*. 2006;i–ii.
40. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;73(3):495–504.
41. Biopolymer Isolation Technology. Silica Membrane Spin Columns [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 20]. Available from: <https://www.bpi-tech.com/spin-columns/>
42. Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017;8(3):1–27.
43. Yulianti E. Pengembangan Teknik Isolasi DNA Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial. In: *Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA serta Peranannya dalam Peningkatan Keprofesionalan Pendidik dan Tenaga Kependidikan*. Yogyakarta; 2006. p. 71–85.
44. Melzak K, Sherwood C, Turner R, Haynes C. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J Colloid Interface Sci*. 1996;181(2):635–44.
45. Ali N, Rampazzo RDCP, Costa ADiT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*. 2017;2017(9):1–13.
46. Lucena-Aguilar G, Sanchez-Lopez AM, Barberan-Aceituno C, Carrillo-Avila JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(4):264–70.
47. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506–13.
48. Morono Y, Terada T, Hoshino T, Inagaki F. Hot-alkaline DNA extraction method for deep-subseafloor archaeal communities. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(6):1985–94.