

## PERBANDINGAN EKSTRAKSI DNA *Salmonella typhi* DARI KULTUR DARAH METODE SPIN COLUMN DAN ALCOHOL BASED

Fadllan, Fauziyah<sup>1</sup>; Djuminar, Ai<sup>1</sup>; Hardiana, Acep Tantan<sup>1</sup>; Dermawan, Asep<sup>1</sup>;  
Ernawati<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung  
e-mail: [fauziyahfadllan97@gmail.com](mailto:fauziyahfadllan97@gmail.com)

### ABSTRAK

Penggunaan metode biologi molekular seperti PCR dapat mempercepat diagnosis demam tifoid serta memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, namun sampel yang berasal dari kultur darah mengandung *Sodium polyanethole sulfonate* (SPS) yang merupakan inhibitor bagi proses PCR. Proses eliminasi SPS terdapat pada tahap ekstraksi DNA sehingga perlu dipilih metode yang tepat untuk mengekstraksi sampel kultur darah agar proses PCR berhasil. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah menggunakan metode *Spin column* dan *Alcohol based*. Metode penelitian yang digunakan bersifat eksperimental, dengan membandingkan ekstraksi DNA dari dua metode tersebut ditambah dengan pengenceran sampel  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  untuk meminimalkan potensi SPS. Hasil ekstraksi kemudian di PCR dan divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose serta didukung dengan pemeriksaan bakteriologis isolat *s.typhi* pada kultur MCA, uji API 20E dan uji serologi. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa metode *Alcohol based* berhasil dalam mengekstraksi sampel kultur darah dan menghasilkan *band* elektroforesis yang jelas hingga pengenceran  $10^{-4}$  namun metode *Spin column* gagal karena tidak menghasilkan *band* elektroforesis bahkan hingga pengenceran  $10^{-4}$ , dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode *Alcohol based* lebih cocok digunakan untuk mengekstraksi sampel kultur darah dibandingkan metode *Spin column*.

**Kata Kunci:** Kultur Darah, *Sodium polyanethole sulfonate*, Ekstraksi DNA

### ABSTRACT

*The use of molecular biology methods such as PCR can speed up the diagnosis of typhoid fever which has high sensitivity and spesifisity , but sample from blood cultures contain Sodium polyanethole sulfonate (SPS) which is an inhibitor for the PCR process. The process of SPS elimination is found at the DNA extraction stage and it is necessary to choose the right method for extracting blood culture samples so that the PCR process is successful. This study aims to compare the results of extraction of Salmonella typhi DNA from blood cultures using the Spin column and Alcohol based method. The research method used is experimental, comparing DNA extraction from the two methods coupled with sample dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  to minimize the potential of SPS. The extraction product then amplified by PCR and visualization by electrophoresis gel agarose and supported by bacteriological examination of isolates S.typhi in MCA cultures , API 20E test and serology test. Based on the results of this study, it is known that the Alcohol based method succeeded in extracting blood culture samples and produced a strong electrophoresis band until  $10^{-4}$  dilution but the Spin column method failed because it did not produce an electrophoresis band even until  $10^{-4}$  dilution, from the results it can be concluded that the Alcohol based method is more suitable for extracting blood culture samples than the Spin column method.*

**Keywords:** Blood Culture, *Sodium polyanethole sulfonate*, DNA extraction

## PENDAHULUAN

Diagnosis demam tifoid ditegakkan dengan menemukan *Salmonella typhi* atau jejaknya pada tubuh pasien melalui pemeriksaan secara mikrobiologis, imunoserologis atau Biologi Molekular. Pemeriksaan mikrobiologis berupa kultur darah atau cairan tubuh lainnya yang merupakan gold standar pemeriksaan demam tifoid, namun pemeriksaan ini membutuhkan waktu yang cukup lama dan rentan terjadinya kontaminasi. Pemeriksaan imunoserologis yaitu dengan memeriksa keberadaan antibodi *S.typhi* dalam serum pasien melalui tes Widal, namun pemeriksaan ini memiliki sensitifitas yang rendah dan hanya bisa dilakukan setelah beberapa hari terjadinya infeksi ketika antibodi telah terbentuk. Pemeriksaan Biologi Molekular yaitu dengan menemukan DNA *S.typhi* dalam sampel pasien demam tifoid melalui proses PCR. Pemeriksaan ini memiliki tingkat spesifitas dan sensitivitas yang tinggi. Diagnosis demam tifoid melalui pemeriksaan Biologi Molekular menjadi metode yang lebih baik dibandingkan pemeriksaan secara mikrobiologis maupun imunoserologis karena memiliki keakuratan yang tinggi dengan waktu pemeriksaan yang cepat. Hasil kultur darah yang positif harus diisolasi kembali menggunakan media agar, namun dengan adanya PCR, hasil kultur darah dapat langsung diperiksa sehingga diagnosis pun dapat dilakukan lebih cepat<sup>1,2,3,4,5</sup>.

Kultur darah mengandung *Sodium polyanethole sulfonate* (SPS) yang merupakan inhibitor bagi proses PCR. SPS dapat mengganggu proses amplifikasi DNA sehingga terkadang menghasilkan hasil negatif palsu. Penelitian David N. Fredricks dan David A. Relman (1998) membuktikan bahwa pada konsentrasi >0.01 mg/ml SPS dapat menghambat proses PCR<sup>6</sup>. Sedangkan SPS yang ditambahkan

pada kultur darah berkisar antar 0.25 – 0.5 mg/ml<sup>7</sup>. Sehingga proses PCR sulit dilakukan pada sampel berupa kultur darah akibat adanya inhibitor tersebut. Keberhasilan proses PCR dari sampel kultur darah tergantung pada metode ekstraksi DNA yang dapat meminimalkan potensi inhibitor akibat adanya kandungan SPS. Metode ekstraksi DNA yang berbeda dapat menghasilkan efek yang berbeda pula terhadap keberadaan SPS. Karena SPS memiliki sifat yang sama dengan DNA, beberapa metode ekstraksi gagal memisahkan SPS dengan DNA sehingga SPS tetap terkandung dalam hasil ekstraksi, beberapa perlakuan seperti pengenceran dibutuhkan untuk meminimalkan efek dari SPS sebagai inhibitor bagi PCR<sup>6</sup>.

Kemampuan ekstraksi DNA untuk meminimalkan potensi SPS tergantung pada prinsip yang digunakan. Metode *Alcohol based* memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan metode lainnya dalam mengekstraksi DNA *Escherichia coli* dari kultur darah. *Salmonella typhi* berbeda dengan bakteri penyebab infeksi lainnya karena *S.typhi* merupakan bakteri interselular. Penelitian Liqing Zhou dan Andrew J. Pollard (2010) berhasil melakukan proses PCR *S.typhi* dari kultur darah melalui proses ekstraksi DNA metode *Spin column* karena metode *Spin column* dari kit komersial yang berbeda memiliki kemampuan yang berbeda pula dalam meminimalkan potensi SPS<sup>7,8,9,10</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah menggunakan metode *Spin column* dan *Alcohol based*.

## METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan

membandingkan hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah (Bactec Biomerieux) menggunakan metode *Spin column* dan metode ekstraksi *alcohol based* (*Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega*). Desain penelitian ini adalah dengan menambahkan 0.5 Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) isolat *Salmonella typhi* dan darah ke dalam media kultur darah dengan perbandingan 1:10 kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sampel kemudian diencerkan pada konsentrasi  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  menggunakan *Nuclease Free Water* (NFW). Pengenceran ini berfungsi untuk mengurangi pengaruh *Sodium Polyanetholesulfonate* (SPS) yang merupakan inhibitor pada reaksi PCR. Selanjutnya sampel tanpa dan dengan pengenceran diekstraksi dengan metode *spin column* dan *alcohol based* sehingga terdapat 10 sampel hasil ekstraksi.

Hasil ekstraksi DNA kemudian di PCR dan dilakukan elektroforesis gel agarose 1.5% pada 100 volt selama 60 menit dan dilihat menggunakan UV transiluminator, hasil band yang terbentuk dari dua metode ekstraksi yang berbeda tersebut kemudian dibandingkan. Isolat *Salmonella typhi* juga akan diuji menggunakan media *Mac Conkey Agar*, uji API dan uji serologi untuk membuktikan bahwa isolate yang digunakan adalah benar *Salmonella typhi*.

Objek penelitian merupakan sampel *spike*, darah (*whole blood*) dari orang sehat yang ditambahkan isolat *S. typhi* yang kemudian ditanam pada botol kultur darah (*Bactec Biomerieux*). Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2019 di Laboratorium Biologi Molekular dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung. Data yang digunakan dalam penelitian ini berupa dokumentasi visual, yaitu pengamatan kualitatif hasil *band*

(elektroforegram) yang terbentuk pada elektroforesis gel agarosa.

## HASIL PENELITIAN

### Hasil Uji Kultur pada MCA

Penelitian yang dilakukan menggunakan isolat murni *Salmonella typhi* yang dikultur pada media *Mac Conkey Agar*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil kultur menghasilkan koloni yang tidak berwarna dan tidak meragikan laktosa. Koloni hasil kultur pada media MC kemudian diambil dan dibuat suspensi bakteri dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml yang setara dengan 0.5 Mc Farland. Suspensi *Salmonella typhi* tersebut kemudian ditanam pada media kultur darah (*Blood Culture Biomerieux*) yang telah ditambah darah sebanyak 5 ml dengan perbandingan 1:10 (Suspensi bakteri= 500 $\mu$ l ; darah= 5000 $\mu$ l) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hasil kultur darah kemudian dikultur kembali pada media *Mac Conkey Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk memastikan bahwa bakteri memang tumbuh pada media kultur darah. Hasil kultur yang kedua juga menghasilkan koloni yang tidak berwarna dan tidak meragikan laktosa. *Salmonella typhi* merupakan bakteri Gram negatif batang golongan non laktosa fermenter sehingga pada media *Mac Conkey Agar*, koloninya tidak berwarna.

### Hasil Uji API

Pada penelitian ini, koloni hasil kultur *S. typhi* pada *Mac Conkey Agar* dibuat suspensi dan diteteskan pada media API 20E Biomerieux. Isolat bakteri dipipet dan dimasukkan masing-masing pada media API 20E hingga menutupi media (khusus untuk media yang diberi tanda garis bawah, isolat ditambahkan hingga penuh menutupi permukaan yang terbuka, sedangkan untuk media yang diberi tanda kotak, isolat diisi hingga memenuhi media

namun permukaan terbukanya harus diisi dengan minyak imersi karena sifat mediana mudah menguap) kemudian media API 20E diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, khusus untuk media TDA ditambahkan

reagen TDA (*Ferric Chloride*); media indol ditambahkan reagen kovacs; media VP ditambahkan reagen 1(KOH) + reagen 2 (*α-Naphthol*). Hasil uji API 20E isolat *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut:

**Tabel 1 Keterangan hasil API 20E isolat *Salmonella typhi*.**

No	Tes	Hasil	Keterangan
1	ONPG	Negatif	Tidak dapat menghidrolisis substrat <i>o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside</i>
2	ADH	Negatif	Tidak Dapat memecah asam amino arginine / memiliki enzim <i>arginine dihydrolase</i>
3	LDC	Positif	Dapat memecah asam amino lisin / memiliki enzim <i>lisin decarboxylase</i>
4	ODC	Negatif	Tidak dapat memecah asam amino ornithine / tidak memiliki enzim <i>ornithine decarboxylase</i>
5	CIT	Negatif	Tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon
6	H2S	Negatif	Tidak memproduksi hidrogen sulfide
7	URE	Negatif	Tidak dapat memecah urea/tidak memiliki enzim urease
8	TDA	Negatif	Tidak dapat memecah tryptophan / tidak memiliki enzim <i>tryptophan deaminase</i>
9	IND	Negatif	Tidak dapat memproduksi indol dari tryptophan / tidak memiliki enzyme <i>tryptophanase</i>
10	VP	Negatif	Tidak dapat memproduksi <i>acetyl methylcarbinol</i> dari fermentasi glukosa
11	GEL	Negatif	Tidak dapat mencairkan gelatin / tidak memiliki enzim gelatinase
12	GLU	Positif	Dapat memfermentasi glukosa
13	MAN	Positif	Dapat memfermentasi mannose
14	INO	Negatif	Tidak dapat memfermentasi inositol
15	SOR	Positif	Dapat memfermentasi sorbitol
16	RHA	Negatif	Tidak dapat memfermentasi rhamnosa
17	SAC	Negatif	Tidak dapat memfermentasi sakrosa
18	MEL	Positif	Dapat memfermentasi melibiosa
19	AMY	Negatif	Tidak dapat memfermentasi amygdalin
20	ARA	Negatif	Tidak dapat memfermentasi arabinose

Hasil API tersebut kemudian dimasukkan ke dalam aplikasi web (*apiweb*) sehingga didapatkan hasil uji API 20E *Salmonella typhi* adalah profile bakteri 4004540 dengan status *Excellent Identification* yang menunjukkan *Significant taxa* 99.9% *Salmonella ser.typhi*.

#### Hasil Uji Serologi

Hasil kultur *Salmonella typhi* pada media *Mac Conkey Agar* kemudian dilakukan uji serologi menggunakan serum aglutinasi untuk *Salmonella typhi* O. Hasil uji serologi adalah positif yaitu terdapat titik-titik putih yang menunjukkan terjadinya aglutinasi antara serum dan bakteri.

#### Hasil PCR

Hasil kultur darah yang telah diinkubasi kemudian dibuat seri pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  menggunakan *Nuclease Free Water*. Sampel tanpa pengenceran dan dengan empat seri pengenceran, kemudian diekstraksi menggunakan dua metode yang berbeda yaitu *Alcohol based (Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega)* dan *Spin column (NEXprep™ Blood gDNA Mini Kit)* sehingga terdapat lima sampel DNA hasil ekstraksi metode *Alcohol based* dan lima sampel DNA hasil ekstraksi *Spin column*. DNA *Salmonella typhi* hasil ekstraksi metode *alcohol based* dan

*spin column* kemudian di amplifikasi (PCR) yang bertujuan untuk memperbanyak jumlah DNA. Proses PCR menggunakan *thermal cycler* dengan reagen NEXpro™ e PCR Master Mix. Pembuatan reagen mix yang digunakan adalah sebanyak 11x reaksi yaitu 10 reaksi untuk sampel dan satu reaksi untuk mencegah kekurangan reagen akibat kesalahan pemipetan. Komposisi reagen dan siklus yang digunakan adalah sebagai berikut:

**Tabel 2 Komposisi reagen master mix yang digunakan**

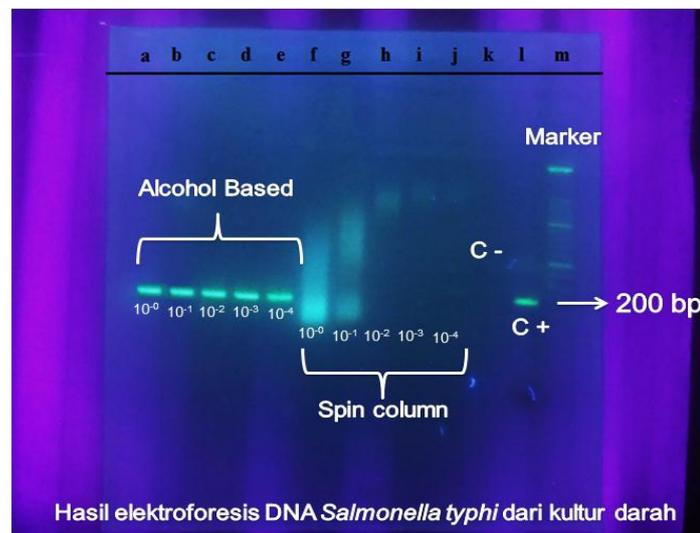
Komponen	Vol(1x)	Vol(11x)
PCR Master Mix	12.5 µl	137.5 µl
Primer forward +Reverse	1 µl	11 µl
Nuclease Free Water	6.5 µl	71.5 µl
Volume Akhir	20 µl	220 µl
Template DNA	5 µl	55 µl

**Tabel 3 Siklus PCR untuk *S.typhi* dengan reagen NEXpro™ e PCR Master Mix**

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	96°C	3 menit	1 siklus
Denaturasi	95°C	30 detik	40 siklus
Annealing	54°C	30 detik	
Extension	72°C	1 menit	

Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan agarose

1.5%. Agarose yang ditimbang adalah 0.9 gram dan dilarutkan dalam 60ml buffer TAE 1x dengan pewarna *Florosafe DNA stain* sebanyak 5 mikron. Masing-masing sampel dicampurkan dengan 1 mikron *loading dye*. Kemudian agarose dicetak dan setelah padat, dimasukkan pada tempat elektroforesis yang telah diisi buffer TAE 1x kemudian dimasukkan sampel, kontrol positif, kontrol negatif dan DNA marker masing-masing sebanyak 5 mikron. Sampel adalah hasil PCR dari ekstraksi DNA metode *alcohol based* dan *spin column* dengan jumlah total sampel adalah sepuluh sampel. Kontrol positif adalah DNA *Salmonella typhi*, kontrol negatif adalah aquades dan marker DNA yang digunakan adalah Marker 100 bp. Gel agarose kemudian dielektroforesis pada 100 volt selama 60 menit dan dilihat kemunculan *band* DNA pada UV transiluminator. Penampakan *band* DNA hasil PCR adalah sebagai berikut:



**Gambar 1**

Penampakan *band* DNA *Salmonella typhi* pada 200 bp, hasil PCR dari ekstraksi DNA metode (a) *Alcohol based* tanpa pengenceran; (b) *Alcohol based* pengenceran  $10^{-1}$ ; (c) *Alcohol based* pengenceran  $10^{-2}$ ; (d) *Alcohol based* pengenceran  $10^{-3}$ ; (e) *Alcohol based* pengenceran  $10^{-4}$ ; (f) *Spin column* tanpa pengenceran (g) *Spin column* pengenceran  $10^{-1}$ ; (h) *Spin column* pengenceran  $10^{-2}$ ; (i) *Spin column* pengenceran  $10^{-3}$ ; (j) *Spin column* pengenceran  $10^{-4}$ ; (k) Kontrol negatif; (l) Kontrol positif; (m) Marker DNA.

Berdasarkan hasil PCR diatas, muncul *band* DNA pada *well* a - e yaitu pada hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah menggunakan metode *alcohol based* tanpa dan dengan pengenceran sedangkan *band* DNA tidak muncul pada *well* f – j yang merupakan hasil ekstraksi DNA metode *spin column* baik tanpa atau dengan pengenceran. *Band* DNA sampel muncul pada *basepair* yang sama dengan kontrol positif yaitu pada 200 *basepair*, kontrol negatif tidak muncul sedangkan marker DNA muncul namun tidak jelas.

## PEMBAHASAN

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat murni *Salmonella typhi*. Sebelum bakteri ditanam pada kultur darah, untuk memastikan bahwa isolat yang digunakan adalah isolat murni *Salmonella typhi* maka dikultur pada *Mac Conkey agar*, uji biokimiawi API 20E dan uji serologi. *Mac Conkey agar* merupakan media selektif differensial untuk golongan bakteri gram negatif batang. Media ini mengandung indikator netral red, inhibitor kristal violet dan empedu untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif serta karbohidrat yang terdapat pada *Mac Conkey agar* adalah laktosa. Media ini berfungsi untuk menguji kemampuan bakteri dalam memfermentasi laktosa. Jika koloni yang tumbuh berwarna pink dan media berubah warna menjadi pink, menunjukkan bakteri bersifat *laktosa fermenter* karena laktosa difermentasi sehingga menyebabkan pH menjadi asam (indikator netral red; asam = pink, basa = kuning) dan sebaliknya jika koloni yang tumbuh tidak berwarna dan media berubah menjadi kuning maka bakteri tidak memfermentasi laktosa menunjukkan bakteri golongan *non laktosa fermenter*. Berdasarkan gambar 1 dan 2 koloni yang tumbuh pada *Mac Conkey agar* tidak berwarna dan tidak

memfermentasi laktosa, hasil ini sesuai dengan sifat *Salmonella typhi* sebagai bakteri *non laktosa fermenter*. Gambar 2 juga menunjukkan bahwa *Salmonella typhi* tumbuh pada media kultur darah (*Blood Culture Biomerieux*) dan menjadi kontrol bahwa media kultur darah yang digunakan dapat menumbuhkan bakteri<sup>11,12,13</sup>.

Tes dilanjutkan dengan uji biokimia yang berguna untuk melihat sifat fisiologis bakteri yang berkaitan dengan metabolisme sel seperti reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel agar menghasilkan energi maupun menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel atau untuk kegiatan seluler seperti pergerakan<sup>14</sup>. Pada pengujian biokimia menggunakan API 20E® Biomerieux menghasilkan profil bakteri 4004540 yang menunjukkan hasil 99.9% adalah *Significant taxa Salmonella typhi* dengan kualitas *excellent identification*. Pada hasil API ini semua tes biokimia cocok dengan sifat *Salmonella typhi* yang ditunjukkan oleh kekosongan kolom *Test against*. Hasil API 20E ini menunjukkan bahwa isolat yang dipakai adalah benar *Salmonella typhi*.

*Salmonella typhi* termasuk golongan bakteri batang gram negatif motil yang memiliki membran *lipopolysaccharide* (LPS) yang terdiri dari kompleks *glycolipid* yang disebut Lipid A yang melekat pada *core lipopolysaccharide*, berupa rantai yang tersusun berulang sehingga berfungsi sebagai penopang. Lipid A mengandung *glucosamine disaccharide* yang melekat pada rantai panjang asam lemak dan *phosphates* yang menjadi ciri khusus masing-masing bakteri. *Lipopolysaccharide* disintesis pada membran sitoplasma dan memiliki banyak fungsi dalam memecahkan asam amino dan memfermentasi gula yang menjadi dasar penentuan pada uji biokimia masing-masing bakteri. *Salmonella* memiliki membran *lipopolysaccharide* yang tersusun dari

*Abe*, *abequose*; *Gal*, *galactose*; *GlcN*, *glucosamine*; *Hep*, *heptulose*; *KDO*, *2-keto-3-deoxyoctonate*; *Man*, *mannose*; *NAG*, *N-acetylglucosamine*; *P*, *phosphate*; *Rha*, *l-rhamnose*, yang membedakannya dengan spesies lain melalui uji biokimiawi dan terkenal dengan bakteri non laktosa fermenter karena tidak dapat memfermentasi laktosa<sup>11,13</sup>.

Pengujian terakhir adalah uji serologi yang berfungsi untuk melihat reaksi antigen antibodi yang membentuk kompleks dan ditunjukkan dengan adanya aglutinasi. Pada pengujian serologi digunakan serum aglutinasi *Salmonella typhi* O produksi Biofarma, berdasarkan gambar 5 terdapat titik-titik putih yang menunjukkan terjadinya aglutinasi antara serum dan bakteri. *Salmonella typhi* memiliki stuktur yang khas yaitu antigen somatik (O), antigen flagel (H) dan antigen Vi yang dapat mengaglutinasi serum, antigen ini yang menyebabkan bakteri menjadi patogen dan menimbulkan penyakit. Antigen-antigen yang terdapat pada masing-masing bakteri menjadi dasar utama adanya klasifikasi atau uji serologi<sup>15</sup>. Sehingga berdasarkan hasil kultur MC, uji biokimia API 20E dan uji serologi terhadap isolat yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan bahwa isolat memang benar adalah *Salmonella typhi*.

Setelah dipastikan bahwa isolat yang digunakan adalah benar *Salmonella typhi* kemudian dilanjutkan dengan kultur pada botol kultur darah. Suspensi bakteri yang digunakan adalah 0.5 Mac Farland atau setara dengan  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml yang ditanam pada media kultur darah dan ditambahkan darah sebagai sampel *spike* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil kultur ini kemudian dibuat seri pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  menggunakan *Nuclease Free Water* dan diekstraksi dengan metode *alcohol based* dan *spin*

*column*. Hasil ekstraksi kemudian di PCR dan di elektroforesis gel agarose.

Ekstraksi DNA berfungsi untuk mengeluarkan DNA *Salmonella typhi* dengan menghancurkan dinding sel dan membran nukleus bakteri. Metode *alcohol based* berprinsip pada penggunaan senyawa kimia untuk penghancuran sel. Metode ini memakan waktu sekitar 3 jam. Reagen yang digunakan pada ekstraksi DNA metode *alcohol based* (*Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega*) adalah:

- *Cell lysis solution* : berfungsi untuk menghancurkan dinding sel *Salmonella typhi* dan sel lainnya.
- *Nuclei lysis solution* : berfungsi untuk menghancurkan membran nukleus bakteri *Salmonella typhi* dan sel lainnya.
- *Protein precipitation solution* : berfungsi untuk menggumpalkan protein atau sisa-sisa sel *Salmonella typhi* dan sel lainnya setelah penghancuran.
- Isopropanol : berfungsi untuk memurnikan DNA dari sisa-sisa sel yang masih tersisa.
- Ethanol : berfungsi untuk presipitasi DNA *Salmonella typhi* dan DNA lainnya. Etanol 70% berperan dalam pemurnian DNA, garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol setelah presipitasi dengan isopropanol untuk menghilangkan residu garam.
- *DNA rehydration solution* : berfungsi untuk merehidrasi atau mengendapkan DNA<sup>16,17</sup>.

Teknik utama yang digunakan adalah sentrifugasi berkecepatan tinggi

yang berfungsi memisahkan DNA dan sisa-sisa sel bekas penghancuran. Hasil akhir ekstraksi DNA metode *alcohol based* adalah berupa pelet DNA yang dilarutkan pada 100ul DNA *rehydration solution*.

Sedangkan ekstraksi DNA metode *spin column (NEXprep™ Blood gDNA Mini Kit)* berprinsip pada menggunakan kolom silika untuk menjaring DNA. Partikel silika bermuatan positif mengikat DNA bermuatan negatif dan menahannya selama sentrifugasi. Metode ini juga menggunakan reagen buffer lysis, proteinase K dan ethanol dalam proses penghancuran dinding sel dan memisahkan DNA <sup>18</sup>. Ekstraksi DNA metode *spin column* memakan waktu sekitar satu jam dengan prosedur yang lebih sederhana dibandingkan dengan metode *alcohol based*. Tahap akhir dari metode ini adalah DNA terperangkap dalam kolom silika yang kemudian dilarutkan menggunakan 100 ul *elution buffer*.

Isolat *Salmonella typhi* yang dipakai adalah  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml dan akan bertambah banyak setelah dikultur pada media kultur darah. Setelah ekstraksi DNA, hasil akhir kedua metode hanyalah DNA, namun hasil ekstraksi ini tidak dapat dihitung jumlahnya karena bukan merupakan DNA murni melainkan semua jenis DNA yang terdapat pada sampel. Karena sampel merupakan *whole blood*, maka hasil ekstraksi DNA ini belumlah murni DNA *Salmonella typhi* tapi juga terdapat DNA leukosit dan yang lainnya.

Untuk membuktikan keefektifitas kedua metode ekstraksi DNA tersebut dapat ditentukan secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose. Namun sebelum proses elektroforesis, jumlah DNA harus diperbanyak dan dimurnikan dahulu dengan primer spesifik *Salmonella typhi* melalui proses *Polymerase Chain Reaction (PCR)* menggunakan *thermal*

*cycler*. Mekanisme *thermal cycler* adalah menyediakan lingkungan yang dikontrol secara thermal untuk sampel dengan adanya blok pemanasan (*heating lid*) dengan lubang untuk menyimpan sampel. Blok akan mengubah suhu pada waktu tertentu dan menghabiskan durasi tertentu pada suhu tertentu dengan adanya siklus suhu yang diprogram pada alat dengan proses utama yaitu denaturasi, annealing dan extension. Proses PCR akan mengamplifikasi DNA menjadi jutaan kali lebih banyak sehingga dapat divisualisasikan pada elektroforesis gel agarose <sup>19</sup>.

Reagen yang digunakan pada penelitian ini adalah NEXpro™ e PCR Master Mix dengan primer spesifik *Salmonella typhi*. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 3 menit berfungsi untuk memecah ikatan hidrogen antara basa komplementer DNA *Salmonella typhi* dari *doublestrand* menjadi *singlestrand*. Kemudian tahap annealing dilakukan pada suhu 54°C selama 30 detik berfungsi agar primer dapat menempel pada DNA template sehingga tahap extension atau perpanjangan dapat dimulai setelah primer menempel pada DNA spesifik. Tahap extension dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit. Seluruh tahapan PCR ini menempuh sebanyak 40 siklus.

Hasil PCR adalah DNA *Salmonella typhi* dengan jumlah jutaan kali lipat dari keadaan awal. Untuk memvisualisasikannya maka dilakukan proses elektroforesis gel agarose. Proses elektroforesis berfungsi untuk memisahkan molekul bermuatan listrik berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam suatu medan listrik. DNA merupakan molekul bermuatan negatif sehingga bila diletakkan pada medan listrik, DNA akan bergerak atau bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif. Pori-pori yang terdapat pada gel agarose akan memisahkan DNA berdasarkan berat molekulnya. Makin

besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya. Visualisasi DNA dilakukan dibawah sinar ultraviolet dengan sebelumnya menggunakan *Florosafe DNA stain* yang dicampurkan saat pembuatan gel agarose yang berfungsi untuk mewarnai DNA sehingga dapat terlihat saat disinari sinar ultraviolet<sup>20,21</sup>.

Berdasarkan gambar 1 terlihat bahwa band DNA *Salmonella typhi* hasil ekstraksi DNA metode *Alcohol based (Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega)* pada well a (tanpa pengenceran); b ( $10^{-1}$ ); c ( $10^{-2}$ ); d ( $10^{-3}$ ); e ( $10^{-4}$ ); terlihat jelas, sedangkan band DNA *Salmonella typhi* hasil ekstraksi DNA metode *Spin column (NEXprep™ Blood gDNA Mini Kit)* pada well f (tanpa pengenceran); g ( $10^{-1}$ ); h ( $10^{-2}$ ); i ( $10^{-3}$ ); j ( $10^{-4}$ ); tidak muncul. Hasil PCR ini tervalidasi oleh adanya kontrol negatif (well k) yang tidak menghasilkan band dan kontrol positif yang menghasilkan band (well l). *Band* sampel muncul sejajar dengan kontrol positif yaitu pada 200 *basepair*. Namun pada penelitian ini, marker DNA tidak terlihat jelas yang mungkin dapat diakibatkan karena kondisi marker yang kurang baik.

Ekstraksi DNA metode *alcohol based* berhasil dalam mengekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah walaupun telah dilakukan pengenceran hingga  $10^{-4}$ , sedangkan metode *spin column* tidak berhasil walaupun telah dilakukan pengenceran hingga  $10^{-4}$ . Pengenceran ini berfungsi untuk meminimalkan potensi SPS (*Sodium polyanethole sulfonate*) yang terdapat pada media kultur darah (*Blood Culture Biomiereux*) yang bersifat inhibitor bagi proses PCR, namun ternyata pengenceran ini tidak berfungsi pada metode *spin column*. Penelitian ini sesuai dengan penelitian David N. Fredricks dan David A. Relman (1998) yang membuktikan bahwa ekstraksi DNA metode *alcohol based* dapat dengan optimal mengekstraksi DNA

dari sampel kultur darah walaupun dengan pengenceran hingga  $10^{-4}$  namun penelitian David N. Fredricks dan David A. Relman (1998) berhasil mengekstraksi DNA *Escherichia coli* dari sampel kultur darah dengan metode *spin column* pada pengenceran  $10^{-4}$ . Sedangkan pada penelitian ini, hasil ekstraksi DNA metode *spin column* tidak berhasil dalam mengekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah dengan pengenceran hingga  $10^{-4}$ . Perbedaan ini mungkin dapat diakibatkan karena perbedaan reagen ekstraksi DNA yang digunakan, faktor lingkungan dan faktor kompetensi.

Media kultur darah mengandung *Sodium polyanethole sulfonate* (SPS) sebagai antikoagulan yang merupakan inhibitor bagi proses PCR. SPS dapat mengganggu proses amplifikasi DNA sehingga terkadang menghasilkan hasil negatif palsu. Inhibitor PCR dapat memblok amplifikasi dan menyebabkan kegagalan proses PCR, terutama karena terganggunya proses enzimatis Taq DNA polymerase sehingga proses amplifikasi tidak dapat berjalan. Inhibitor PCR harus dieliminasi agar proses PCR dapat berjalan, pada penelitian sebelumnya eliminasi SPS dilakukan dengan beberapa perlakuan seperti pengenceran atau hal lain yang dibutuhkan untuk meminimalkan efek dari SPS sebagai inhibitor bagi PCR.

Penggunaan *SPS-free blood culture medium* terkadang digunakan khusus untuk PCR agar SPS tidak mengganggu proses amplifikasi. Namun, kunci utama untuk mengeliminasi SPS sebagai inhibitor PCR adalah terdapat pada tahap ekstraksi DNA sehingga pemilihan metode ekstraksi yang tepat sangat penting dilakukan.. Metode ekstraksi DNA yang berbeda memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengeliminasi SPS. Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan, untuk mengeliminasi SPS dari sampel kultur darah adalah dengan

mengkombinasikan pencucian (*washing step*) secara berulang dengan penambahan sentrifugasi, *sodium iodide lysis solution* dan *alcohol precipitation*. Penambahan tahap *alkaline wash step* dengan *heat lysis* juga telah berhasil dilakukan<sup>7,8,9</sup>.

SPS adalah polianion dengan berat molekul tinggi yang larut dalam air tetapi tidak larut dalam alkohol. SPS bersifat sebagai antikoagulan karena dapat berikatan dengan hemoglobin dan membran eritrosit. Pada ekstraksi DNA metode *alcohol based*, darah berikatan dengan SPS dan dapat membawa SPS ke bagian pelet (*lower organic phase*) dan SPS tidak larut dalam alkohol sedangkan DNA akan berada pada bagian supernatan (*aqueous phase*) sehingga pada tahap awal ekstraksi DNA metode *alcohol based*, SPS dan DNA telah terpisahkan dan hasil ekstraksi DNA pun tidak mengandung SPS melainkan murni hanya DNA. Proses PCR pada sampel hasil ekstraksi metode *alcohol based* dapat berjalan dan elektroforesis gel agarose pun dapat berhasil. Baik sampel tanpa pengenceran ataupun dengan pengenceran, band DNA terlihat dengan jelas saat elektroforesis gel agarose. Ekstraksi DNA metode *alcohol based* terbukti berhasil mengeliminasi SPS dari sampel kultur darah.

Sedangkan pada metode *spin column*, SPS dan DNA merupakan molekul polianion yang bersifat dapat berikatan dengan kolom silika. SPS mengikat silika karena adanya molekul *chaotropes* sehingga saat ekstraksi DNA metode *spin column*, baik DNA maupun SPS terjebak dalam kolom silika. Proses sentrifugasi tidak dapat meloloskan SPS dari kolom karena molekulnya terlalu besar untuk melewati membran. Keberadaan SPS yang terjebak bersama DNA pada kolom menjadikan penghalang DNA untuk lolos pada tahap *elution step*. SPS menyumbat membran silika

karena molekulnya besar dan DNA tidak dapat lolos pada tahap akhir ekstraksi menyebabkan hasil ekstraksi DNA metode *spin column* tidak mengandung DNA. Walaupun dilanjutkan dengan proses PCR dan elektroforesis, hal ini tidak berfungsi karena hasil ekstraksi tidak mengandung DNA.

Pengenceran dimaksudkan untuk memperkecil konsentrasi SPS dan diharapkan metode ini dapat berhasil dilakukan pada pengenceran  $10^{-4}$  namun teknik pengenceran ini tidak berhasil. Band DNA hasil ekstraksi metode *spin column* tidak terlihat sama sekali baik pada sampel tanpa pengenceran maupun dengan pengenceran hingga  $10^{-4}$ . Ekstraksi DNA metode *spin column* tidak cocok digunakan untuk sampel yang berasal dari kultur darah yang mengandung SPS.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka metode ekstraksi *alcohol based* lebih baik dari pada metode *spin column* untuk mengekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah yang mengandung SPS. Sampel hasil ekstraksi metode *alcohol based* dapat menghasilkan band DNA yang jelas baik tanpa atau dengan pengenceran hingga  $10^{-4}$ . Sedangkan metode *spin column*, tidak berhasil dalam mengekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah baik tanpa atau dengan pengenceran hingga  $10^{-4}$ .

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah yang mengandung *Sodium Polyanethole Sulfonate* metode *Alcohol Based* lebih baik daripada metode *Spin Column* untuk sampel yang berasal dari kultur darah.

Disarankan penelitian lanjutan mengenai perbandingan hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dari kultur darah

menggunakan metode *Alcohol Based* pada merk reagen yang berbeda (Trizol kit, Qiagen kit, dll), metode *Boiling, Phenol Chloroform* dan *Magnetic bead purification*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Singh Sarman. 2001. *Typhoid Fever: Pathogenesis and Laboratory Diagnosis*. New Delhi : Journal, Indian Academy of Clinical Medicine. Vols. Vol. 2, No. 1 and 2.
2. CDC. 2002. *Guideline for the laboratory diagnosis and antibiotic treatment of individuals with suspected typhoid fever*. USA: Communicable Disease Control And Provincial Laboratory Services Kwazulu Natal Department Of Health.
3. NHLS. 2016. *Typhoid: NICD recommendations for diagnosis, management and public health response*. South Africa : Centre for Eteric Disease A division of the National Health Laboratory Service.
4. WHO. 2011. *Guidelines for the Management of Typhoid Fever* . Zimbabwe : World Health Organization.
5. Maguinsay Vegloure. 2017. *Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid*. Philipine : Philippine Society for Microbiology and Infectious Diseases.
6. Fredricks David N, Relman David A. 1998. *Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate*. USA : Journal of Clinical Microbiology Vol. Vol.36 No.10.
7. Dreyer, Andries William. 2012. *Blood Culture Systems: From Patient to Result, Sepsis: An Ongoing and Significant Challenge*. INTECH : Vol. Chapter
15. <http://dx.doi.org/10.5772/50139>.
8. Regan John F. [et al.] 2012. *Technical Advance : A Sample Extraction Method for Faster, More Sensitive PCR-Based Detection of Pathogens in Blood Culture*. The Journal of Molecular Diagnostics. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.10.001.
9. Zhou Liqing, Pollard Andrew J. 2010. *A Fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of Salmonella enterica serovar Typhi*.
10. Biomerieux. 2002. *API 20E Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods*. Biomerieux: USA.
11. Brooks Geo F [et al.]. 2013. *Medical Microbiology Journal*. United States : The McGraw Hill Companies, Inc. Vol. 26th edition. 978-0-07-1815-78-9.
12. Batra Sahil. 2019. *Paramedics World [Online] Morfology and Culture Characteristics of Salmonella typhi*. Publish: May 18<sup>th</sup>, 2018. Taken: February 13<sup>th</sup>, 2019. <https://paramedicsworld.com/salmonella-typhi/morphology-culture-characteristics-of-salmonella-typhi/>
13. Mark Gladwin M.D, Trattler Bill. 2000. *Clinical Microbiology made ridiculously simple*. Vol. Edition 3.
14. Pelczar, Michael J dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar- Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
15. Dennis Kunkel Microscopy, INC. 2008. *Germs that infect Humans, Bacteria-Part 3: Salmonella typhi*. Chin.gc.ca. Publish: 2008 Taken: February

- 24<sup>th</sup> 2019.  
<http://www.virtualmuseum.ca/edu/>
16. Anandika Dhaliwal. 2013. *DNA Extraction and Purification*. Rutgers University, New Jersey, United States. Publish: 2008  
Taken: February 21<sup>th</sup> 2019.  
DOI//dx.doi.org/10.13070/mm.e n.3.191.  
<https://www.labome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
  17. Tushar Chauchan. 2018. *Different types of dna extraction methods*. Publish: October 21<sup>th</sup> 2018  
Taken: February 21<sup>th</sup> 2019.  
<http://geneticeducation.co.in/different-types-of-dna-extraction-methods/>
  18. Anandika Dhaliwal. 2013. *DNA Extraction and Purification*. Rutgers University, New Jersey, United States. Publish: 2008  
Taken: February 21<sup>th</sup> 2019.  
DOI//dx.doi.org/10.13070/mm.e n.3.191.  
<https://www.labome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
  19. Labcompare. 2013. *Thermal Cyclers: Behind the Technology*. Publish: July 3<sup>rd</sup> 2013  
Taken: February 24<sup>th</sup> 2019.  
<https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/140609-Thermal-Cyclers-Behind-the-Technology/>
  20. Yun, Pel Lee. 2012. *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*. Los Angeles : Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California Los Angeles. Vol. [www.jove.com](http://www.jove.com). - doi:10.3791/3923.
  21. Amrita Vishwa Vidyapeetham. (2011) . *Polimerase Chain Reaction (PCR)*. Publish: 2011

Taken: February 24<sup>th</sup> 2019.  
Virtual Amrita Laboratories  
Universalizing Education.  
<http://vlab.amrita.edu/>