

PERBANDINGAN NILAI PENGUKURAN KUANTITATIF HASIL EKSTRAKSI DNA *SALMONELLA TYPHI* MENGGUNAKAN METODE *BOILING*, *NAOH*, KIT KOMERSIAL

Dayanti, Fadla Ghina¹; Djuminar, Ai¹; Dermawan, Asep¹; Tantan, Acep²

¹ Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung,
Email : fadlaghina@gmail.com

² PT Biofarma (Persero)

ABSTRAK

Demam tifoid merupakan penyakit yang sering terjadi di negara berkembang, secara global *S.typhi* merupakan penyebab utamanya. Di Indonesia, kasus tersangka tifoid cenderung meningkat dari tahun ke tahun dengan rata-rata kesakitan 500/100.000 penduduk dengan kematian antara 0,6 – 5 %. Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi demam tifoid yaitu pemeriksaan berbasis bakteriologis, uji serologi, serta pemeriksaan berbasis biologi molekuler. Ekstraksi DNA merupakan tahapan yang penting dalam teknik molekuler untuk mendapatkan isolat DNA. Jenis penelitian yang dilakukan adalah quasi eksperimental dengan mengekstraksi DNA *S.typhi* menggunakan beberapa metode dan variasi perlakuan. Produk hasil ekstraksi diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan Spektrofotometer *NanoDrop*. Hasil penelitian menunjukkan nilai tertinggi diperoleh dari produk hasil ekstraksi dengan menggunakan metode kit komersial, konsentrasi yang diperoleh adalah 2,15 ng/ μ L dan kemurniannya mencapai 1,83. Pada metode *boiling*, konsentrasi dan kemurnian tertinggi didapatkan dari ekstraksi dengan pemanasan 100°C selama 25 menit, dengan konsentrasi 1,9 ng/ μ L dan kemurnian mencapai 1,73. Sedangkan pada metode ekstraksi dengan menggunakan NaOH, kemurnian tertinggi didapatkan dari ekstraksi dengan menggunakan NaOH 25 μ M, dengan konsentrasi 1,7 ng/ μ L dan kemurnian mencapai 1,72.

Kata kunci : *Salmonella typhi*, ekstraksi DNA

ABSTRACT

Typhoid fever is a disease that often occurs in developing countries, globally S. typhi is the main cause. In Indonesia, cases of typhoid tend to increase from year to year with an average illness of 500 / 100,000 people with deaths between 0.6 - 5%. Laboratory tests to detect typhoid fever are bacteriological based examinations, serological tests, and molecular biology based examinations. DNA extraction is an important step in molecular techniques to obtain DNA isolates. The type of research conducted was quasi-experimental by extracting DNA S.typhi using several methods and variations. The extracted product was measured by its concentration and purity using a Spectrophotometer NanoDrop. The results showed that the highest value was obtained from the extracted product using the commercial kit method, the concentration obtained was 2.15 ng / μ L and the purity reached 1.83. In the boiling method, the highest concentration and purity was obtained from extraction by heating 100°C for 25 minutes, with a concentration of 1.9 ng / μ L and purity reaching 1.73. Whereas in the extraction method using NaOH, the highest purity was obtained from extraction using 25 μ M NaOH, with a concentration of 1.7 ng / μ L and purity reaching 1.72.

Key words : *Salmonella typhi*, DNA extraction

PENDAHULUAN

Food or waterborne disease seperti diare dan demam tifoid merupakan kasus sehari-hari yang kerap dijumpai di lapangan. Demam tifoid merupakan penyakit yang sering terjadi di negara berkembang, disebabkan oleh beberapa serovar *Salmonella enterica* termasuk *S. typhi* dan *S. paratyphi*, dan secara global *S. typhi* merupakan penyebab utama.¹

Tifoid atau tifus abdominalis banyak ditemukan dalam kehidupan masyarakat, baik di perkotaan maupun di pedesaan. Di Indonesia, penyakit ini bersifat endemik dan merupakan masalah kesehatan masyarakat, dari telaah kasus di rumah sakit besar di Indonesia, kasus tersangka tifoid menunjukkan kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun dengan rata-rata kesakitan 500/100.000 penduduk dengan kematian antara 0,6 – 5 %.²

Diagnosis tifoid ditegakkan berdasarkan manifestasi klinis dan laboratorium. Manifestasi klinis demam tifoid bervariasi dan tidak spesifik sehingga membuat penegakkan diagnosis menjadi sulit. Beberapa penyakit yang secara klinis sulit dibedakan dengan demam tifoid yang sering menyebabkan kesalahan diagnosis antara lain demam dengue, malaria, meningitis dan penyakit demam lainnya. Kecepatan dan ketepatan metode diagnosis akan mempermudah pengobatan dan mencegah komplikasi yang berat dan fatal. Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi demam tifoid yaitu pemeriksaan berbasis bakteriologis, berupa biakan *S. typhi*, uji serologi untuk mendeteksi antigen-antibodi *S. typhi* serta pemeriksaan berbasis biologi molekuler yaitu pemeriksaan pelacak DNA *S. typhi*.³

Teknik kultur merupakan gold standard dalam mengidentifikasi bakteri. Namun, saat ini teknik molekuler sudah mulai menggeser teknik kultur, karena teknik molekuler dapat mengidentifikasi bakteri dengan cepat dengan nilai

sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi.^{4,5}

Ekstraksi DNA merupakan tahapan yang penting dalam teknik molekuler untuk mendapatkan isolat DNA. Isolat DNA nantinya akan diamplifikasi menggunakan PCR. Tentunya diharapkan isolat yang diekstrak mengandung konsentrasi dan kemurnian yang tinggi. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dapat diukur menggunakan spektrofotometer *NanoDrop*.^{6,7}

Terdapat beberapa metode ekstraksi DNA, dimana masing-masing metode memiliki kekurangan dan kelebihan. Ghatak et al. pada tahun 2013 berhasil mendapatkan isolat DNA bakteri berhasil diekstraksi menggunakan *phenol-chloroform*, namun metode tersebut menggunakan bahan organik yang berbahaya. Lain halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurul Sarifah pada tahun 2018, ekstraksi DNA *Eschericia coli* dilakukan dengan teknik boiling dan NaOH. Didapatkan hasil optimal untuk mengekstraksi DNA *E.coli* pada teknik *boiling* yaitu pada suhu 100°C selama 25 menit, sedangkan pada teknik NaOH yaitu pada konsentrasi NaOH 25 µM.^{8,9}

Penelitian Sunarno dkk. pada tahun 2014, menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi dengan metode *boiling* dan NaOH mempunyai kualitas dan kuantitas yang cukup untuk pemeriksaan PCR hingga 9 CFU/µL sel bakteri/reaksi, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode *boiling* dan NaOH cukup efektif dan efisien untuk diaplikasikan pada metode PCR untuk *Corynebacterium diphtheriae*.¹⁰

Ahmed dan Anas pada tahun 2017 melakukan ekstraksi DNA pada bakteri Gram negatif dengan teknik *boiling* pada suhu 100°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan tahap presipitasi menggunakan etanol,

dengan hasil isolat DNA dengan konsentrasi yang tinggi. Teknik *boiling* yang digunakan dalam penelitian Ahmed dan Anas merupakan teknik yang cepat, mudah dan murah sehingga dapat diaplikasikan untuk ekstraksi DNA bakteri Gram negatif.¹¹

METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian quasi eksperimental. Desain penelitian ini dibuat dengan cara melakukan ekstraksi DNA *S. typhi* menggunakan beberapa metode ekstraksi, diantaranya metode *boiling* (dengan suhu pemanasan 100°C, dan lama waktu pemanasan selama 5, 10, 15, 20, dan 25 menit), ekstraksi menggunakan NaOH (dengan variasi konsentrasi 10, 15, 20, dan 25 µM), dan menggunakan kit komersial. Data yang diperoleh berupa konsentrasi dan kemurnian DNA *S. typhi* hasil dari ekstraksi menggunakan metode *boiling*, NaOH, dan kit komersial yang diukur menggunakan Spektrofotometer *NanoDrop*.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu uji penegasan *Salmonella typhi* ATCC 14028 menggunakan media *Salmonella Shigella Agar*, API 20E, dan uji serologi. Selanjutnya bakteri diekstraksi menggunakan metode *boiling*, NaOH, dan kit komersial.

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei hingga Juni 2019 di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung, sampai dengan proses ekstraksi selesai. Produk hasil ekstraksi selanjutnya diukur konsentrasi dan kemurniannya Spektrofotometer *NanoDrop* yang dilakukan di Biofarma.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa nilai konsentrasi dan kemurnian DNA, dianalisis dan disajikan secara deskriptif untuk mengetahui perbandingan metode ekstraksi yang dilakukan terhadap DNA *Salmonella typhi* ATCC 14028.

HASIL

Uji Penegasan

Sampel *S. typhi* ATCC 14028 diremajakan pada media *Salmonella Shigella Agar*, koloni *S. typhi* berwarna putih/tidak berwarna dengan diameter 1-2 mm. Uji penegasan dilakukan dengan API 20E, dengan hasil 99,9% *Salmonella spp.* Selanjutnya dilakukan "slide-test" aglutinasi dengan antisera spesifik, *slide test* menunjukkan hasil positif.

Hasil Ekstraksi Metode *Boiling*

Berdasarkan Tabel 1, hasil ekstraksi *S. typhi* ATCC 14028 metode *boiling* didapatkan konsentrasi DNA tertinggi sebesar 1,9 ng/µL dengan nilai kemurnian DNA tertinggi sebesar 1,73 dengan perlakuan pendidihan dengan pada suhu 100°C selama 25 menit, sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh perlakuan pendidihan dengan suhu 100°C selama 5 menit dengan hasil pengukuran konsentrasi dsDNA 1,2 ng/µL dan kemurnian DNA 1,34.

Hasil Ekstraksi Metode Penambahan NaOH

Berdasarkan Tabel 2, konsentrasi NaOH terbaik untuk mengekstraksi DNA *S. typhi* ATCC 14028 adalah pada konsentrasi 25 µM, terlihat pada angka kemurnian tertinggi yang didapat yaitu 1,72 dengan konsentrasi dsDNA 1,7 ng/µL. Sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh penambahan NaOH dengan konsentrasi 10 µM dengan hasil pengukuran konsentrasi dsDNA 1,1 ng/µL dan kemurnian DNA 1,49.

Hasil Ekstraksi Metode Kit Komersial

Tabel 3 menunjukkan nilai pengukuran kuantitatif DNA hasil dari ekstraksi *S. typhi* ATCC 14028 menggunakan kit komersial, konsentrasi rata-rata yang diperoleh adalah 2,15

ng/ μ L dengan kemurnian rata-rata mencapai 1,83.

Efektivitas dan Efisiensi Metode

Tabel 4 menunjukkan bahwa dari segi waktu, metode yang paling cepat adalah metode ekstraksi menggunakan NaOH yang berbeda beberapa menit dengan teknik *boiling*.

Sedangkan dari segi biaya dan tingkat kemudahan, metode *boiling* sedikit lebih murah dan lebih mudah dibandingkan ekstraksi menggunakan NaOH. Sementara itu, proses ekstraksi DNA dengan kit komersial memerlukan waktu yang lebih lama, biaya yang lebih mahal, dan proses pengerjaan yang lebih sulit namun nilai kemurnian paling tinggi.

Tabel 1 Hasil Ekstraksi Metode *Boiling*

No	Suhu Pemanasan (°C)	Lama waktu pemanasan (menit)	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)			Kemurnian DNA (λ A260 / 280)		
			Pengulangan			Pengulangan		
			1	2	Rata2	1	2	Rata2
1.	100	5	1,2	1,3	1,25	1,34	1,35	1,345
2.	100	10	1,4	1,5	1,45	1,36	1,40	1,38
3.	100	15	1,6	1,6	1,6	1,52	1,57	1,545
4.	100	20	1,8	1,8	1,8	1,57	1,57	1,57
5.	100	25	1,9	1,9	1,9	1,71	1,73	1,72

Tabel 2 Hasil Ekstraksi Metode Penambahan NaOH

No	Konsentrasi NaOH (μ M)	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)			Kemurnian DNA (λ A260 / 280)		
		Pengulangan			Pengulangan		
		1	2	Rata2	1	2	Rata2
1.	10	1,1	1,2	1,15	1,49	1,5	1,495
2.	15	1,2	1,2	1,2	1,52	1,55	1,535
3.	20	1,4	1,5	1,45	1,56	1,57	1,565
4.	25	1,6	1,7	1,65	1,67	1,72	1,695

Tabel 3 Hasil Ekstraksi Metode Kit Komersial

Konsentrasi DNA (ng/ μ L)			Kemurnian DNA (λ A260 / 280)		
Pengulangan			Pengulangan		
1	2	Rata2	1	2	Rata2
2,1	2,2	2,15	1,82	1,84	1,83

Tabel 4 Hasil Ekstraksi Metode Kit Komersial

	<i>Boiling</i>	NaOH	Kit Komersial
Waktu	20-45 menit	20 menit	2 jam
Biaya	Sangat murah	Murah	Lebih mahal
Kemudahan	Sangat mudah	Murah	Lebih sulit
Konsentrasi	Lebih rendah	Paling rendah	Paling tinggi
Kemurnian	Lebih rendah	Paling rendah	Paling tinggi

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, nilai pengukuran kuantitatif dari hasil ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dengan menggunakan metode *boiling*, NaOH, dan kit komersial menunjukkan angka yang relatif tinggi

dan tidak jauh berbeda antara metode satu dengan yang lainnya. Diantara ketiga metode tersebut, masing-masing metode memiliki kekurangan dan kelebihan, pemilihan metode ekstraksi biasanya dilakukan dengan mempertimbangkan kemurnian DNA yang diperlukan dalam aplikasi

selanjutnya, waktu, serta biaya yang dibutuhkan.

Ekstraksi DNA merupakan tahapan penting dalam teknik molekuler. Ekstraksi DNA diperoleh dengan cara merusak atau memecahkan dinding sel, sehingga DNA keluar dari dalam sel.¹² Penelitian ini menggunakan sampel *S. typhi* ATCC 14028, sehingga diharapkan DNA yang terekstraksi benar-benar DNA yang berasal dari *S. typhi* ATCC 14028.

S. typhi adalah bakteri Gram negatif, yang memiliki dinding sel yang tersusun oleh peptidoglikan yang tipis, sehingga dinding selnya lebih mudah dihancurkan.¹³ Sel bakteri Gram negatif dapat dilisis dengan mudah melalui pemanasan dan penambahan basa dibandingkan dengan bakteri Gram positif, seperti *Bacillus spp.* Selain itu, kepekaan bakteri terhadap kondisi basa berbeda-beda tergantung dari jenisnya. Sebagai contoh, *Listeria monocytogenes* lebih resisten dibandingkan dengan *E.coli* meskipun keduanya sama-sama merupakan bakteri Gram negatif.¹⁰

Berbagai metode ekstraksi DNA telah banyak dikembangkan, seperti metode boiling dan penggunaan NaOH, yang prosesnya cukup mudah, cepat, murah, dan ramah lingkungan dibandingkan dengan kit komersial.¹¹ Kerusakan dinding sel dapat terjadi jika sel kontak dengan basa kuat seperti NaOH, sehingga teknik *boiling* dan NaOH dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA.¹⁰

Kit komersial yang digunakan pada penelitian ini adalah produk Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) yang memiliki prinsip *salting out* atau penambahan garam. *Salting out* ini dapat mengganggu ikatan hidrogen molekul DNA.¹⁴

Konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dinilai salah satunya dengan metode absorbansi (*optical density*),

seperti Spektrofotometer *NanoDrop* yang digunakan pada penelitian ini. Alat tersebut pada prinsipnya adalah menghitung perbedaan penyerapan cahaya UV dimana pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm karena DNA mengandung basa purin dan pirimidin yang mampu menyerap sinar ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm, sedang kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Nilai kemurnian DNA dihitung dengan cara absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 (A_{260}/A_{280}). Isolat DNA dikatakan murni jika rasio absorbansi berada pada rentang 1,8 - 2,0.^{15,16}

Hasil ekstraksi pada penelitian ini adalah dsDNA (double strand DNA) *S.typhi*. Limit deteksi dsDNA yang dimiliki Spektrofotometer *NanoDrop* yaitu 0,4-15.000 ng/ μ L. Volume minimal yang dibutuhkan yaitu 1,0-2,0 μ L. Spesifisitas yang dimiliki alat ini tidak terlalu tinggi, karena pada panjang gelombang 260 nm, bukan hanya dsDNA yang mampu menyerap panjang gelombang tersebut, namun juga jenis asam nukleat yang lainnya seperti ssDNA (*single strand* DNA) dan RNA (*ribonucleic acid*). Atas permasalahan tersebut, digunakan hukum Lambert-Beer dengan menggunakan faktor konversi 50 khusus untuk mengukur dsDNA, sehingga yang terukur hanya dsDNA.¹⁶

Pada hasil penelitian ini belum diperoleh hasil isolat DNA yang murni pada teknik *boiling* maupun NaOH, hal ini ditunjukkan dengan nilai rasio absorbansi <1,8 atau tidak berada pada rentang 1,8-2,0 (Tabel 1 dan Tabel 2). Nilai tersebut didapat dari hasil pengukuran absorbansi rasio pada panjang gelombang 260/280 nm, dimana DNA diserap pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan diserap pada panjang gelombang 280 nm, maka semakin

besar nilai kontaminannya semakin rendah nilai kemurniannya. Kontaminan yang dapat diserap kuat pada panjang gelombang 280 nm diantaranya protein dan fenol.¹⁵

Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi menggunakan kit komersial (Tabel 3) yang menghasilkan kemurnian DNA sebesar 1,84, teknik komersial lebih mampu menghasilkan isolat DNA dengan kemurnian yang tinggi yang mendekati rentang 1,8-2,0.¹⁵

Rendahnya nilai kemurnian DNA hasil ekstraksi dengan teknik *boiling* dan NaOH dapat disebabkan karena pada kedua teknik tersebut tidak adanya penambahan protein precipitation solution seperti pada kit komersial yang mampu mengendapkan senyawa protein, sehingga DNA dapat terpisah dengan senyawa protein. Proses presipitasi dan pencucian berperan penting dalam menghasilkan DNA yang murni. Pada teknik *boiling* dan NaOH, proses presipitasi hanya dilakukan satu kali yang berfungsi untuk memisahkan media dengan sel bakteri, sedangkan proses pencucian tidak dilakukan sama sekali sehingga menjadi suatu kelemahan metode tersebut. Sementara itu, pada kit komersial proses presipitasi dan pencucian dilakukan sebanyak tiga kali dengan penambahan protein precipitation solution, isopropanol dan etanol 70%. Ketiga zat tersebut dapat menginduksi perubahan struktur molekul DNA yang menyebabkan molekul DNA terpresipitasi dari larutan dan senyawa debris, sehingga isolat DNA yang dihasilkan pada kit komersial lebih murni.¹⁷

Hasil uji DNA secara kuantitatif ini menunjukkan, bahwa DNA yang diisolasi dengan teknik *boiling*, NaOH, dan kit komersial pada penelitian ini memiliki beberapa kelemahan dan kelebihan. Berdasarkan Tabel 4.4, efektivitas dan efisiensi ekstraksi DNA pada teknik *boiling* dan NaOH, dapat

menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi dengan proses kerja lebih cepat, mudah, dan murah dibandingkan dengan kit komersial. Selain itu, limbah yang dihasilkan pada ekstraksi menggunakan metode *boiling* dan NaOH lebih sedikit dibandingkan dengan kit komersial, sehingga lebih ramah lingkungan. Sedangkan kelemahannya adalah baik pada metode *boiling* dan NaOH nilai kemurnian yang dihasilkan lebih rendah dari nilai kemurnian DNA yang diekstraksi menggunakan kit komersial, hal ini disebabkan karena pada metode *boiling* dan NaOH tidak dilakukan pencucian dan pemurnian DNA.

Proses kuantifikasi DNA dengan *quantitative* PCR (qPCR) dapat berjalan jika kemurnian DNA berada pada rentang 1,6 – 1,9. Sehingga hasil penelitian menggunakan metode *boiling* dan NaOH ini dapat diaplikasikan untuk proses qPCR, karena kemurnian yang dihasilkan >1,6.¹⁸ Begitupun hasil ekstraksi DNA dengan teknik *boiling* dan NaOH yang dapat diaplikasikan untuk uji PCR.¹⁰ Berdasarkan beberapa referensi hasil penelitian tersebut, mengindikasikan bahwa hasil ekstraksi menggunakan metode *boiling* dan NaOH untuk *S. typhi* ATCC 14028 juga dapat digunakan sebagai template DNA untuk proses PCR berdasarkan nilai pengukuran kuantitatifnya.

Keterbatasan Penelitian

Metode yang dilakukan pada penelitian ini memiliki kekurangan yaitu kuantifikasi DNA pada alat Spektrofotometer *NanoDrop* akan mengukur semua DNA yang terdapat didalam hasil ekstraksi termasuk DNA kontaminan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa perbandingan hasil pengukuran

kuantitatif DNA *S. typhi* ATCC 14028 dengan berbagai metode diantaranya yaitu, tingkat kemurnian yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan metode *boiling* adalah 1,72 dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 25 menit, sedangkan metode ekstraksi menggunakan NaOH dengan konsentrasi 25 µM adalah 1,70, dan tingkat kemurnian yang paling tinggi dari ketiga metode yang diuji coba adalah ekstraksi dengan Kit Komersial yaitu 1,83.

DAFTAR RUJUKAN

1. Hadinegoro, Sri Rezeki. 2012. *Update Management of Infectious Diseases and Gastrointestinal Disorder*. Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2006. Pedoman Pengendalian Demam Tifoid. Jakarta: Kemenkes.
3. World Health Organization. 2003. *Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever*. WHO/V&B/03.07. Geneva
4. Sheikha, A., Robert E, dan Jianping X. 2018. *Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity and Traceability*. Canada: John Wiley and Sons.
5. Doerr, H. W. 2013. *Replacement of Biologic by Molecular Techniques in Diagnostic Virology: Thirty Years after The Advent of PCR Technology—Do We Still Need Conventional Methods?*. *Med Microbiol Immunol* 202: 391-392.
6. Elkins Kelly M. 2013. *Forensic DNA Biology Chapter 4-DNA Extraction*. US: Elseiver.
7. Dhaliwal, A. 2013. *DNA Extraction and Purification*.
8. Ghatak, S., Muthukumaran RB, dan Nachimuthu SK. 2013. *A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis*. *J Biomol Tech* 24(4): 224-31.
9. Sarifah, Nurul. 2018. Optimasi Ekstraksi DNA *Escherichia coli* Menggunakan Teknik *Boiling* dan NaOH. Poltekkes Kemenkes Bandung.
10. Sunarno, Fauzul M, Nyoman F, Amarila M, Anis K, dan Amin S. 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk Pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit. Kesehat* 42(2): 85-92.
11. Ahmed, O. B. Dan Anas S. 2017. *Quality Improvement of the DNA Extracted by Boiling Method in Gram Negative Bacteria*. *International Journal of Bioassays* 6(4).
12. Wulansari, N., Mala N., dan Nurjanah. 2015. Deteksi Ikan Tuna dan Produk Olahannya Berbasis Protein dan DNA Barcoding. *JPHPI* 18(2).
13. Jawetz, Melnick & Aldeberg's. 2012. *Medical Microbiology 26th edition*. The McGraw Hill.
14. Fernando, C. O., T. G. S. Paim, K. C Reiter, A. Rieger, dan P. A. D'azevedo. 2014. *Evaluation of Four Different DNA Extraction Methods in Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56(1): 29–33.
15. Fatchiyah, S. Widyarti, E. L. Arumningtyas, dan S. Permana. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Malang: Universitas Brawijaya.

16. Thermo Fisher Scientific. 2012. *NanoDrop Lite User Guide*. Thermo Fisher Scientific.
17. Nurhayati, B. dan S. Darmawati. 2017. *Biologi Sel dan Molekuler*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
18. Dibbern, *et al.* 2015. *Evaluation of Methods of DNA extraction from Staphylococcus aureus in Milk for Use in real-time PCR*. Genetic and Molecular Research Journal.