

Perbandingan Kuantitas dan Kualitas DNA *Bacillus* sp. antara *Heat Treatment* dan Filter berbasis Kit

The Quantity and Quality Comparison of Bacillus sp. DNA between Heat Treatment and Filter Based Kit

Durrotun Ni'mah¹, Muhammad Zainul Fadli¹, Rio Risandiansyah^{1*)}
¹Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, Indonesia

ABSTRAK

Penegakkan diagnosis infeksi bakteri dapat dilakukan secara cepat dengan metode isolasi DNA yang telah disederhanakan, seperti *Heat Treatment* yang merupakan metode ekstraksi DNA sederhana dan ekonomis, namun tingkat deteksi dan kuantifikasi terhadap *Bacillus* sp. masih belum diketahui. Penelitian ini bertujuan membandingkan kuantitas dan kualitas DNA dari *Bacillus* sp. dengan menggunakan metode ekstraksi *Heat Treatment* dan metode isolasi *Filter Based Kit*. Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimen secara *in vitro*. *Heat Treatment* dibandingkan dengan *Filter Based Kit* berdasarkan *Limit of Detection* (LoD) and *Limit of Quantification* (LoQ). Analisa data menggunakan uji ANOVA serta uji *Honesty Significant Diference* (HSD). *Yield DNA* yang didapatkan *Heat Treatment* pada konsentrasi terbesar adalah 5 µg/ml, sedangkan dengan *Filter Based Kit* adalah 3.67 µg/ml. Nilai LoD *Heat treatment* dan *Filter Based Kit* adalah 1.61 µg/ml dan 5.72 µg/ml, sedangkan nilai LoQ *Heat treatment* dan *Filter Based Kit* adalah 4.87 µg/ml dan 17.34 µg/ml. Jumlah bakteri yang melebihi nilai LoD dan LoQ *Heat treatment* adalah 10¹ CFU/ml dan 10⁴ CFU/ml, sementara LoD dan LoQ *Filter Based Kit* adalah >10⁴ CFU/ml. Kuantitas DNA *Bacillus* sp. dengan metode *Heat Treatment* lebih baik dibandingkan dengan *Filter Based Kit*. Kualitas DNA *Bacillus* sp. baik dengan metode *Heat Treatment* maupun *Filter Based Kit* tidak baik.

Kata kunci: *isolasi DNA, Bacillus* sp., *heat treatment, Filter Based Kit*

ABSTRACT

Diagnosis of bacterial infection can be done quickly with simplified DNA isolation methods, such as Heat Treatment, which is a simple and inexpensive DNA isolation method, but detection and quantification levels of Bacillus sp. still unknown. This study aims to compare the quantity and quality of DNA isolates from Bacillus sp. using Heat Treatment etraction method and Filter Based isolation method. This research used in vitro experiment method. Heat Treatment is compared to Filter Based Kit according to Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantification (LoQ). Data analyzed with ANOVA and Honesty Significant Difference (HSD). DNA yield obtained by Heat Treatment at the highest concentration was 5 µg/ml, whereas Filter Based Kit was 3.67 µg/ml. LoD of the Heat treatment and Filter Based Kit were 1.61 and 5.72 µg/ml, while LoQ of the Heat treatment and Filter Based Kit were 4.87 and 17.34 µg/ml. The number of bacteria that exceeded the LoD and LoQ of Heat Treatment was 10¹ and 10⁴ CFU/ml, whereas the LoD and LoQ of Filter Based Kit was >10⁴ CFU/ml. The quantitiy of Bacillus sp. DNA with Heat Treatment method is better than Filter Based Kit. The quality of Bacillus sp. DNA both the Heat Treatment and Filter Based Kit methods are not good.

Keywords: *DNA isolation, Bacillus* sp., *heat treatment, Filter Based Kit*

^{*)} Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD., Jurusan Pendidikan Dokter, FK, Universitas Islam Malang Telp. 081217210321 dan e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

Pendahuluan

Saat ini, proses identifikasi bakteri masih membutuhkan waktu yang cukup lama dengan metode konvensional seperti kultur serta uji biokimiawi [1]. Metode-metode tersebut dapat mengidentifikasi bakteri secara umum, namun hasil yang diperoleh seringkali tidak spesifik [2]. Oleh karena itu dibutuhkan metode identifikasi bakteri yang cepat dan tepat seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [3]. PCR merupakan metode yang baik untuk deteksi bakteri karena praktis, sensitif dan spesifik [4].

Isolasi DNA merupakan langkah penting sebelum pelaksanaan PCR. Isolasi DNA dengan metode yang baik dapat menghasilkan DNA yang banyak dengan memaksimalkan kemurnian serta membebaskan DNA dari kontaminan [5]. Tujuan penelitian ini yaitu untuk melihat konsentrasi *Bacillus* sp. terkecil yang dapat diisolasi dengan metode yang ekonomis serta membutuhkan waktu yang singkat. Oleh karena itu sering dilakukan penyederhanaan metode isolasi DNA. Salah satu bentuk penyederhanaan metode yang akan diteliti adalah metode *Heat Treatment* (HT). HT merupakan metode ekstraksi DNA melalui *boiling* dalam *water bath* atau *microwave*, sehingga waktu pengerjaan metode ini sangat singkat dan minim biaya [6]. Kuantitas dan kualitas HT dalam memperoleh konsentrasi DNA dibandingkan dengan *Filter Based Kit* (FBK) yang merupakan metode isolasi DNA yang dikembangkan dari metode *silica gel* [7]. Metode ini melakukan langkah isolasi DNA berupa ekstraksi, presipitasi dan purifikasi sehingga kemungkinan terjadinya kontaminasi rendah [7]. Metode ini membutuhkan alat tertentu serta langkah pengerjaannya kompleks yang menyebabkan metode ini lama dan kurang ekonomis. Berdasarkan hal itu, peneliti ingin melihat kuantitas dan kualitas DNA dari berbagai konsentrasi dari *Bacillus* sp. menggunakan metode ekstraksi HT dan metode isolasi FBK.

Kualitas dan kuantitas DNA bakteri dapat dilihat berdasarkan hasil kemurnian dan *yield* [8]. Nilai kemurnian dan *yield* akan divalidasi dengan menilai *Limit of Detection* (LoD) dan *Limit of Quantification* (LoQ) [9]. LoD dan LoQ merupakan parameter standart performa dari sebuah metode analitik [10]. LoD adalah jumlah atau konsentrasi analit terkecil dari sampel yang dapat dibedakan dari blanko [9]. Sedangkan LoQ ialah jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat dikuantifikasi [11]. Belum ada penelitian lain yang membahas mengenai perbedaan DNA *Bacillus* sp. dengan metode HT dan FBK. Maka dari itu, penelitian ini akan membandingkan metode HT dan FBK berdasarkan LoD dan LoQ.

Material dan Metode

Alat dan Bahan

***In vitro Bacillus* sp:** Sampel *Bacillus* sp. adalah hasil isolasi yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA dan tidak dipublikasikan. Bakteri diidentifikasi secara mikroskopis (Gram positif, berspora) dan morfologi bakteri pada media NA (koloni sirkuler putih).

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan desain penelitian analitik kuantitatif. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA.

Cara Kerja

Inokulasi *Bacillus* sp.: Stok media padat *nutrient agar* (NA) (komposisi: 0.5 % peptone, 0.3 % ekstrak daging sapi/ekstrak ragi, 1.5 % agar, 0.5 % NaCl, Aquades) yang berisi *Bacillus* sp. diambil

dan ditumbuhkan pada stok media cair *nutrient broth*. Media cair yang sudah keruh, kemudian dibiakkan dalam media padat NA. Oshe digunakan untuk mengambil *Bacillus* sp. yang telah dibiakkan pada media padat NA. Oshe tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *normal saline* (NS) 10 mL, lalu dicampur secara merata.

Kuantifikasi *Bacillus* sp.: Stok *Bacillus* sp. diencerkan 10^{-12} kali dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml dan disiapkan satu kontrol yang berisi NS tanpa mengandung bakteri. Metode yang digunakan untuk menghitung bakteri yaitu metode *direct count* dengan *Total Platelet Count* (TPC). *Bacillus* sp. diinokulasi dengan cara menuangkan suspensi bakteri pada media padat NA yang sudah dibagi menjadi 8 bagian (pengenceran 10^{-5} - 10^{-12}), kemudian ditetesi *Bacillus* sp. sesuai dengan tingkat pengencerannya. Media padat diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-20 jam. Setelah diinkubasi, jumlah koloni *Bacillus* sp. dihitung sesuai letak pembagiannya. Jumlah bakteri sama dengan jumlah koloni dikalikan faktor pengenceran. Selanjutnya, jumlah bakteri dalam *plate* dengan tiga kali pengulangan di rata-rata. Metode selanjutnya yaitu menggunakan spektrofotometri dengan $\lambda = 600$ nm pada setiap tabung reaksi. Metode ini dilakukan untuk memudahkan pengulangan.

Ekstraksi DNA *Bacillus* sp. Menggunakan Metode *Heat Treatment* : *Bacillus* sp. diambil 5-10 oshe dari stok media padat lalu dipindahkan ke stok media cair yang berisi 10^5 CFU/ml. Stok tersebut diencerkan hingga 10^1 CFU/ml ke dalam *microcentrifuge tube* 1.5 ml. Stok bakteri dimasukkan ke dalam aquades dengan suhu 100°C selama 10 menit kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. *Bacillus* sp. diberi larutan DNA *rehydration solution* sebanyak 1 ml, kemudian dilakukan pengukuran *yield* dan kemurnian dengan NanoDrop.

Isolasi DNA *Bacillus* sp. Menggunakan Metode *Filter Based Kit*: *Bacillus* sp. diambil 5-10 oshe dari stok media padat lalu dipindahkan ke stok media cair yang berisi 10^5 CFU/ml. Stok tersebut diencerkan hingga 10^1 CFU/ml ke dalam *microcentrifuge tube* 1.5 ml. Bakteri disentrifus dengan kecepatan maksimum selama 1 menit dan dibuang supernatannya. Selanjutnya, ditambahkan 100 μ l EL *buffer* lalu dicampur dengan pellet dan diinkubasi selama 10-60 menit pada suhu 37°C. Pellet ditambahkan 100 μ l RS *buffer* lalu dicampur rata. Kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 56°C dan ditambahkan 200 μ l GA *buffer* serta disentrifus dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. *Supernatant* dipindahkan ke *microcentrifuge tube* baru yang steril lalu ditambahkan 400 μ l BA *buffer*, campur rata. Campuran tersebut dipindahkan ke *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. Larutan G *binding buffer* sebanyak 500 μ l ditambahkan ke *spin column* lalu disentrifus dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. 500 μ l *washing buffer* ditambahkan pada *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. Proses tersebut diulangi sebanyak satu kali. Kemudian, 100 μ l *elution buffer* ditambahkan dan diinkubasi dengan suhu ruangan selama 1 menit. Sampel disentrifus lagi dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit lalu *spin column* dilepas dari *tube*. *Microcentrifuge tube* tersebut berisi DNA yang telah terfilter. Proses selanjutnya yaitu pengukuran *yield* dan kemurnian dengan NanoDrop.

Pengukuran *Yield* dan Kemurnian: Pengukuran *yield* dan kemurnian hasil isolasi DNA metode *HT* dan *FBK* dilakukan dengan NanoDrop pada $\lambda = 230, 260$ dan 280 nm. Sedangkan hasil kemurnian DNA baik apabila rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,8-2,0 [8].

Perhitungan *Limit of Detection (LoD)* dan *Limit of Quantification (LoQ)*: Perhitungan LoD dan LoQ diperoleh dari standar deviasi respons kurva dan *slope* kurva kalibrasi sesuai persamaan [12]:

$$LoD = 3.3 (Sy/S) \dots\dots\dots (1)$$

$$LoQ = 10 (Sy/S) \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

LoD = *Limit of detection*

LoQ = *Limit of quantification*

Sy = Standar Deviasi hasil rerata semua sampel

S = *Slope* kurva kalibrasi

Analisis Data: Data yang diperoleh dikonversikan menggunakan *software Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) lalu dilakukan uji parametrik dengan menggunakan uji statistik *One Way Analysis of Varians* (ANOVA). Kemudian dapat dilakukan uji lanjutan yaitu *Post hoc analitic Honesty Significance Different* (HSD). Data dinyatakan signifikan jika $p < 0.05$.

Hasil dan Diskusi

Hasil Penelitian

Kuantifikasi *Bacillus* sp.: Hasil kuantifikasi *Bacillus* sp. yang dilakukan dengan metode TPC (*Total plate count*) dan spektrofotometri ditunjukkan pada Tabel 1. Metode TPC dilakukan pada tiga sampel dengan masing-masing pengulangan sebanyak tiga kali. Ketiga ulangan tersebut dilakukan pada faktor pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-12} . Selain itu juga dilakukan spektrofotometri pada ketiga sampel bakteri.

Hasil TPC sampel *Bacillus* sp. 1 pada pengenceran 10^{-5} diperoleh jumlah bakteri 1.33×10^5 CFU/ml. Pada sampel *Bacillus* sp. 1 dan 2 dengan pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-12} tidak ditemukan bakteri viabel. Jumlah bakteri tertinggi sebesar 2×10^5 CFU/ml ditemukan pada pengenceran 10^{-5} pada sampel *Bacillus* sp. 2. Hal tersebut dipastikan dengan hasil spektrofotometri yaitu sebesar 0.308 nm. Sedangkan jumlah bakteri terendah yaitu 0.67×10^5 CFU/ml pada sampel *Bacillus* sp. 3 yang dibuktikan dengan hasil spektrofotometri 0.190 nm. Pada sampel *Bacillus* sp. 3 masih ditemukan bakteri viabel pada pengenceran 10^{-6} .

Tabel 1. Hasil *Total Plate Count* (TPC) dan Spektrofotometri *Bacillus* sp.

Sampel <i>Bacillus</i> sp.	Faktor Pengenceran								Jumlah koloni bakteri (CFU/ml)	Absorbansi (nm)
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}		
1	1.33	0	0	0	0	0	0	0	1.33×10^5	0.308
2	2	0	0	0	0	0	0	0	2×10^5	0.353
3	0.67	0.33	0	0	0	0	0	0	0.67×10^5	0.190

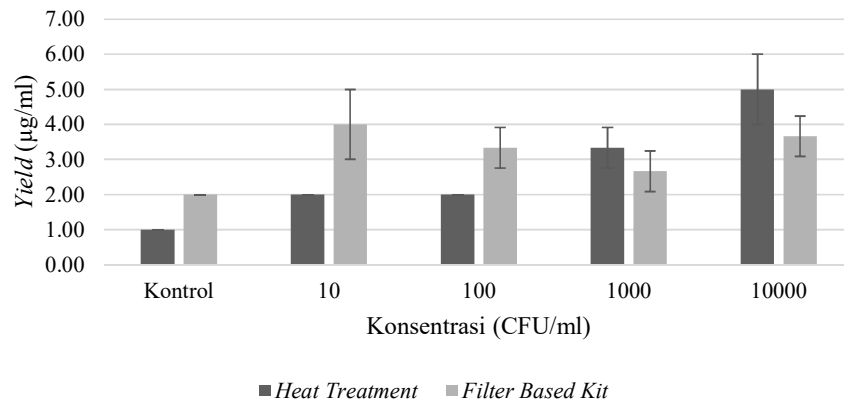
Keterangan: Data sampel *Bacillus* sp. dinyatakan dalam rata – rata \pm SD dengan n = 3

Perbandingan Kuantitas DNA antara *Heat Treatment* dan *Filter Based Kit* pada *Bacillus* sp.: Hasil *yield* metode HT dan FBK pada *Bacillus* sp. ditunjukkan pada Tabel 2. Sedangkan perbandingan *yield* antara metode HT dengan FBK ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 2. Hasil *yield* metode HT dan FBK pada *Bacillus* sp.

Konsentrasi (CFU/ml)	<i>Yield</i> ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Heat Treatment</i>	<i>Filter Based Kit</i>
Kontrol	1 ± 0	2 ± 0
10^1	2 ± 0	4 ± 1
10^2	2 ± 0	3.33 ± 0.58
10^3	3.33 ± 0.58	2.67 ± 0.58
10^4	5 ± 1	3.67 ± 0.58

Keterangan: Data *yield* dinyatakan dalam rata – rata \pm SD dengan n = 3



Gambar 1. Grafik Perbandingan *yield* HT dan FBK

Keterangan:

Data *yield* dinyatakan dalam rata – rata ± SD

HT = Heat Treatment

FBK = Filter Based Kit

a = Beda signifikan dengan HT Kontrol

b = Beda signifikan dengan HT 10

c = Beda signifikan dengan HT 100

d = Beda signifikan dengan HT 1000

e = Beda signifikan dengan HT 10000

f = Beda signifikan dengan FBK kontrol

g = Beda signifikan dengan FBK 10

Hasil *yield* metode HT pada Tabel 2. didapatkan *yield* tertinggi pada konsentrasi 10^4 CFU/ml. Sedangkan pada metode FBK hasil *yield* tertinggi yaitu pada konsentrasi 10^1 CFU/ml. Pada Gambar 1. *yield* metode HT sedikit lebih tinggi dibanding *yield* metode FBK. Namun, *yield* metode HT dan FBK termasuk rendah. Hasil uji statistik perbandingan metode HT dan FBK pada *Bacillus* sp. pada Gambar 1. menunjukkan berbeda signifikan ($p=0.00$) antara masing-masing konsentrasi. Uji *post hoc* HSD diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) antara konsentrasi 10^1 CFU/ml pada metode HT dan FBK.

Uji statistik pada metode HT menunjukkan berbeda signifikan ($p=0.00$) pada masing-masing konsentrasi. Uji *post hoc* HSD pada metode HT diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) antara kontrol dengan konsentrasi 10^3 CFU/ml dan 10^4 CFU/ml. Pada konsentrasi 10^1 CFU/ml berbeda signifikan ($p<0.05$) dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml. Konsentrasi 10^2 CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) dengan 10^4 CFU/ml. Konsentrasi 10^3 CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) dengan kontrol dan konsentrasi 10^4 CFU/ml. Konsentrasi 10^4 CFU/ml diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) dengan kontrol, konsentrasi 10^1 CFU/ml, 10^2 CFU/ml, dan 10^3 CFU/ml. Uji statistik pada metode FBK menunjukkan berbeda signifikan ($p=0.02$) antar masing-masing konsentrasi. Uji *post hoc* HSD pada metode FBK diperoleh hasil berbeda signifikan ($p<0.05$) antara kontrol dan konsentrasi 10^1 CFU/ml.

Perbandingan Kualitas DNA antara Heat Treatment dan Filter Based Kit pada *Bacillus* sp.: Hasil kemurnian HT dan FBK ditunjukkan pada Tabel 3. Kemurnian metode HT tidak dapat dideteksi pada kontrol, konsentrasi 10^1 CFU/ml, 10^3 CFU/ml dan 10^4 CFU/ml. Pada konsentrasi 10^2 CFU/ml diperoleh rata – rata kemurnian -2 µg/ml. Sedangkan kemurnian metode FBK dapat dideteksi pada konsentrasi 10^1 CFU/ml dan konsentrasi 10^3 CFU/ml dengan rata – rata masing-masing 2.22 µg/ml dan -0.67 µg/ml. Hasil kemurnian dinyatakan baik apabila dalam *range* $1.8 - 2.0$ µg/ml. Sedangkan pada kedua metode tidak mencapai *range* tersebut maka hasil kemurnian metode HT dan FBK kurang baik.

Tabel 3. Perbandingan Kemurnian antara HT dengan FBK

Konsentrasi (CFU/ml)	Kemurnian (A_{260}/A_{280})	
	<i>Heat Treatment</i>	<i>Filter Based Kit</i>
Kontrol	<i>nd</i>	<i>nd</i>
10 ¹	<i>nd</i>	2.22 ± 0.69
10 ²	-2 ± 0	<i>nd</i>
10 ³	<i>nd</i>	-0.67 ± 3.21
10 ⁴	<i>nd</i>	<i>nd</i>

Keterangan: Data dalam rata – rata ± SD dengan n = 3; *Nd*= not detected

Perhitungan LoD dan LoQ Metode *Heat Treatment* dan *Filter Based Kit* pada *Bacillus* sp.: Hasil perhitungan LoD dan LoQ terhadap metode *HT* dan *FBK* ditunjukkan pada Tabel 4. Nilai LoD metode *HT* ialah 1.61 µg/ml, sedangkan nilai LoQ ialah 4.87 µg/ml. Hasil LoD metode *HT* diperoleh dari 3.3 x (0.46/0.94), sementara hasil LoQ diperoleh dari 10 x (0.46/0.94). Pada metode *FBK* nilai LoD ialah 5.72 µg/ml, sedangkan nilai LoQ ialah 17.34 µg/ml. Perhitungan LoD metode *FBK* berasal dari hasil 3.3 x (0.36/0.21) dan LoQ berasal dari hasil 10 x (0.36/0.21).

Tabel 4. Nilai LoD dan LoQ metode HT dan FBK pada *Bacillus* sp.

Metode isolasi	LoD		LoQ	
	Rumus	Hasil (µg/ml)	Rumus	Hasil (µg/ml)
<i>HT</i>	3.3 (Sy/S)	1.61	10 (Sy/S)	4.87
<i>FBK</i>		5.72		17.34

Keterangan: Sy = Standar deviasi rerata semua sampel ; S = Slope kurva kalibrasi

Pembahasan

Kuantifikasi *Bacillus* sp.: Kuantifikasi *Bacillus* sp. dilakukan dengan metode *direct count*. Metode *direct count* menggunakan *Total Plate Count* (TPC) bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri yang viabel [13]. Proses TPC diawali dengan pengenceran serial yang bertujuan untuk mendapatkan koloni dalam *range* 30-300 CFU/ml [13]. TPC melibatkan beberapa pengenceran dalam kelipatan 10. Jumlah pengenceran dipilih berdasarkan perkiraan awal kepadatan kultur [13]. Pengenceran serial pada penelitian ini dilakukan pada faktor pengenceran 10⁻¹ sampai dengan 10⁻¹².

Jumlah koloni yang dapat dihitung dengan *reliable* adalah antara 30-300 koloni bakteri [13]. Standart nilai TPC ialah tidak lebih dari 300 x 10⁵ CFU/ml” [13]. Hasil dinyatakan *To Numerous to Count* (TNTC) apabila didapatkan lebih dari 300 koloni” [14]. Jumlah koloni kurang dari 30 menandakan bahwa koloni bakteri terlalu sedikit dan tidak representatif [14]. Pengenceran 10⁻¹ sampai dengan 10⁻⁴ dapat menghasilkan TNTC yang akan menyulitkan perhitungan koloni secara akurat. Sehingga pada penelitian ini, TPC dilakukan pada faktor pengenceran 10⁻⁵ hingga 10⁻¹². Hasil estimasi jumlah bakteri yang diperoleh pada kelompok 1, 2 dan 3 secara berurutan adalah 1.33 x 10⁵ CFU/ml, 2 x 10⁵ CFU/ml dan 0.67 x 10⁵ CFU/ml. Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa ketiga sampel menghasilkan jumlah koloni yang sedikit (< 30 koloni). Hasil yang terlalu sedikit bisa disebabkan karena kurangnya pencampuran sampel secara menyeluruh saat proses pengenceran serial sehingga distribusi bakteri kurang menyeluruh [13].

Kuantitas dan Kualitas DNA dari *Bacillus* sp. pada Beberapa Konsentrasi dengan Metode *Heat Treatment*: Keberhasilan isolasi DNA dapat dilihat dari kuantitas dan kualitasnya. Kuantitas DNA dapat dilihat berdasarkan hasil *yield* yang diperoleh dari NanoDrop. *Yield* ditunjukkan dengan *concentration* dalam NanoDrop. Prinsip NanoDrop ialah mengukur sinar UV pada A_{260} yang diserap oleh DNA dan A_{280} yang diserap oleh protein [7]. Pengukuran *yield* bertujuan untuk mengetahui taksiran jumlah DNA bakteri yang terkandung dalam sampel [15]. *Concentration* ($\mu\text{g/ml}$) dapat diperoleh dari absorbansi pada A_{260} dikali faktor C ($50 \mu\text{g/ml}$ = konversi unit dari *double-helix* DNA) dikali faktor dilusi [16]. Absorbansi 260 secara tidak langsung dapat menggambarkan konsentrasi DNA. Pembacaan A_{260} dinyatakan valid apabila berada pada *range* 0.1 – 0.5. Pembacaan diluar *range* tersebut tidak mencerminkan konsentrasi DNA [17].

HT melakukan proses ekstraksi yang dilakukan dengan memanaskan sampel pada suhu 100°C selama 10 menit, sehingga waktu pengerjaannya singkat [16]. Selain itu, *HT* tidak membutuhkan reagen kimia atau instrumen yang banyak sehingga biaya yang dibutuhkan minimal. Pada Tabel 2. hasil *yield* metode *HT* berkisar antara 1 – 5 $\mu\text{g/ml}$. Pada data tersebut, *yield* metode *HT* terbilang rendah karena *concentration* dinyatakan tinggi apabila lebih dari 10 $\mu\text{g/ml}$. Rendahnya *yield* metode *HT* karena jumlah bakteri yang sedikit. Nilai LoD metode *HT* ialah 1.61 $\mu\text{g/ml}$ yang berarti dengan konsentrasi 10^1 CFU/ml sampel sudah dapat dideteksi. Sedangkan nilai LoQ metode *HT* ialah 4.87 $\mu\text{g/ml}$ yang berarti membutuhkan konsentrasi 10^4 CFU/ml untuk bakteri dapat dikuantifikasi. Hal tersebut sesuai dengan hipotesis penelitian sehingga metode *HT* dapat dijadikan alternatif dalam memperoleh konsentrasi DNA *Bacillus* sp.. *HT* merupakan metode yang lebih cepat, sederhana dan efektif daripada metode *FBK* [18]. Selain itu, metode *HT* lebih baik dari segi biaya, sedikitnya langkah yang dibutuhkan, waktu pelaksanaan serta hasil DNA.

Hasil konsentrasi DNA *Bacillus* sp. selanjutnya dilakukan pengamatan kualitas DNA bakteri. Kualitas DNA bakteri dapat diperoleh dari hasil kemurnian sampel. Kemurnian diukur menggunakan NanoDrop yang ditunjukkan dengan perbandingan absorbansi 260 nm dengan 280 nm [7]. Hasil dikatakan murni apabila rasio perbandingan A_{260}/A_{280} adalah 1.8 – 2.0 $\mu\text{g/ml}$ [22]. Pada penelitian ini diperoleh kemurnian $< 2 \mu\text{g/ml}$ pada konsentrasi 10^2 CFU/ml pada metode *HT*. Hasil kemurnian dibawah 1.8 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan bahwa selama proses isolasi DNA, protein, karbohidrat dan lipid tidak dapat dihilangkan secara sempurna [20]. Hal ini bisa disebabkan karena *HT* hanya melakukan proses ekstraksi saja tanpa melalui proses presipitasi dan purifikasi [1]. Sehingga metode *HT* berpotensi masih didapatkan makromolekul lain seperti protein, karbohidrat, dan lipid [21]. Kemurnian yang rendah juga disebabkan oleh konsentrasi bakteri yang rendah sehingga protein dan RNA kontaminan juga rendah yang mengakibatkan angka tidak terbaca.

Kuantitas dan Kualitas DNA dari *Bacillus* sp. pada Beberapa Konsentrasi dengan Metode *Filter Based Kit*: Isolasi DNA dengan *FBK* (*Bioflux DNA extraction kit*) menggunakan teknologi *silica-gel-membrane* dan *spin column* [20]. Metode *FBK* sebagai representasi metode konvensional karena *FBK* melakukan proses ekstraksi, presipitasi dan purifikasi dengan langkah yang lebih sederhana [22]. Kuantitas dan kualitas DNA *Bacillus* sp. ditentukan oleh hasil *yield* dan kemurnian pada berbagai konsentrasi bakteri. Pada Tabel 2. hasil rerata *yield* metode *FBK* pada sampel kontrol 2 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 10^1 CFU/ml 4 $\mu\text{g/ml}$, 10^2 CFU/ml 3.33 $\mu\text{g/ml}$, 10^3 CFU/ml 2.67 $\mu\text{g/ml}$, dan 10^4 CFU/ml 3.67 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan data tersebut *yield* metode *FBK* tergolong rendah. Hal tersebut dapat disebabkan karena jumlah bakteri yang sedikit. Selain itu, sitosol bakteri mungkin masih utuh sehingga menghasilkan sampel yang memiliki *yield* rendah [18]. Adapun rendahnya *yield* dapat disebabkan karena jumlah bakteri rekomendasi dari Bioflux kit ialah 10^7 - 10^9 CFU/ml untuk mendapatkan hasil yang optimal [19]. Sedangkan pada penelitian ini jumlah bakteri yang digunakan ialah 10^5 CFU/ml yang relatif lebih rendah dibanding dengan rekomendasi kit. Di sisi lain, langkah dalam metode *FBK* melibatkan manipulasi *multi-step* yang dapat mempengaruhi *yield* DNA [18]. Langkah yang banyak dan kompleks meningkatkan potensi *yield* yang diperoleh kurang maksimal [18].

Nilai LoD metode *FBK* ialah 5.72 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai LoQ ialah 17.34 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut menunjukkan bahwa membutuhkan konsentrasi bakteri diatas 10^4 CFU/ml untuk dapat dideteksi dan

dikuantifikasi. Hal yang menyebabkan hasil *FBK* tidak lebih rendah dari *HT* ialah faktor bakteri serta cara kerja *kit*. *FBK* merupakan metode yang dikembangkan dari metode *silica-gel* atau *glass beads* sehingga menghasilkan metode *silica membrane spin column*. Prinsip *silica membrane spin column* ialah memiliki afinitas tinggi terhadap senyawa negatif DNA yang diikat pada senyawa positif *silica particles* [24]. DNA diikat oleh *silica particles* dengan erat lalu *washing buffer* akan menghilangkan semua kontaminan lewat *membrane* [25]. Kekurangan membran *silica* adalah ketidakmampuannya untuk mempurifikasi DNA dengan adanya senyawa *phenolic* dan substansi *humic* [9]. Senyawa ini merupakan senyawa negatif sehingga dapat berikatan dengan *membrane silica* yang seharusnya mengikat DNA saja [9]. Beberapa spesies *Bacillus* sp. dapat menghasilkan enzim *tyrosinase* yang berkontribusi dalam meningkatkan substansi *humic* [26]. Oleh karena itu, tanpa dilakukannya penghilangan senyawa *phenolic* dan substansi *humic* pada *Bacillus* sp. maka hasil isolasi DNA *FBK* kurang maksimal.

Pada metode *FBK* diperoleh kemurnian antara $-0.67 \mu\text{g/ml}$ hingga $2.22 \mu\text{g/ml}$ serta ada beberapa yang tidak terdeteksi. Rasio kemurnian dibawah $1.8 \mu\text{g/ml}$ atau diatas $2.0 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan bahwa adanya kontaminasi RNA, *wash solution*, *ethanol* atau protein [15]. Adanya kontaminasi *ethanol* bisa disebabkan karena proses purifikasi yang kurang sempurna [19]. Adapun kontaminan RNA dapat disebabkan karena kurang maksimalnya kerja RNase [15]. Proteinase K berfungsi untuk melisiskan protein-protein dalam sel bakteri, namun pada *kit* ini tidak didapatkan Proteinase K *solution*, sehingga dapat mempengaruhi hasil *yield* dan kemurnian sampel [23]. Metode ini juga melakukan langkah yang banyak meliputi penggantian 4 – 6 *microcentrifuge tube*, beberapa tahap inkubasi, presipitasi, elusi, pencucian dan pengeringan atau membutuhkan peralatan khusus. Hal tersebut dapat menyebabkan hasil kemurnian yang buruk [18].

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisa data serta pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kuantitas DNA *Bacillus* sp. metode ekstraksi *HT* lebih tinggi dibanding metode isolasi *FBK*. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil konsentrasi minimum metode *HT* agar *Bacillus* sp. dapat terdeteksi dan terkuantifikasi ialah 10^1 CFU/ml dan 10^4 CFU/ml. Sedangkan konsentrasi minimum metode *FBK* agar *Bacillus* sp. dapat terdeteksi dan terkuantifikasi ialah diatas 10^4 CFU/ml. Kualitas DNA *Bacillus* sp. metode ekstraksi *HT* dan metode isolasi *FBK* diluar *range* kemurnian yang baik yaitu berkisar antara $1.8 - 2.0 \mu\text{g/ml}$.

Ucapan Terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada IOM (Ikatan Orangtua Mahasiswa) yang telah menyediakan pembiayaan untuk melakukan penelitian.

Daftar Pustaka

- [1] Lu Z, Guo W, Liu C. 2018. Isolation, identification, and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*.16-0572.
- [2] Ping DY, Chao XZ, Lian YG, Wei L, Feng ZQ, Hong YD, Jie L, Li C, Yun Z, Yi XC. 2019. A newly isolated *Bacillus subtilis* strain named *WS-1* inhibited diarrhea and death caused by pathogenic *Escherichia coli* in newborn piglets. *Frontiers in Microbiology*. 10:1248.
- [3] Muthén LK, Muthen B. 2017. *Mplus user's guide: Statistical analysis with latent variables, user's guide*. Muthén & Muthén;
- [4] Gupta N. 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of cytology*. 36(2):116-7.

- [5] Boesenberg-Smith KA, Pessaraki MM, Wolk DM. 2012 Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*. 34(1):1-6.
- [6] Mulyani Y, Purwanto A, Nurruhwati I. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*). *Jurnal Akuatika*. 2(1).
- [7] Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*. 73(3):495-504.
- [8] Syafaruddin S, Randriani E, Santoso TJ. 2011. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Journal of Industrial and Beverage Crops*. 2(2):141601.
- [9] Currie LA. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*. 67(10):1699-723.
- [10] Nutz S, Döll K, Karlovsky P. 2011. Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 401(2):717-26.
- [11] Munch DJ, Wasko M, Flynt E, Wendelken SC, Scifres J, Mario JR, Hunt M, Gregg D, Schaeffer T, Clarage M, Lumpkin MS. *Validation and Peer Review of US Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis*.
- [12] Sains P. nd. Validasi Metode Untuk Analisis Kandungan Uranium Menggunakan Potensiometer T-90. *Metode*:3:4.
- [13] Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. revision A.
- [14] Mayanti B, Ariesyady H. 2009. Identifikasi Keberagaman Bakteri pada Commercial-Seed Pengolah Limbah Cair Cat. *Jurnal Teknik Lingkungan*. 16(1):52-61.
- [15] Murtiyaningsih H. 2017. Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (Random Amplified Polimorfic DNA). *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*. 15(1).
- [16] Mulyatni AS, Budiani A, Taniwiryono D. nd. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *E-Journal Menara Perkebunan*. 80(2).
- [17] BIOL 3716: Molecular Biology I. *Protocol: Spectrophotometric Determination of DNA Quantity and Purity*. Genetics & Biotechnology Lab. v091708. Diterima Tanggal 23 Agustus 2020. URL: <http://crcooper01.people.yzu.edu/3716-Determining%20DNA%20Conc-F08.pdf>
- [18] Ahmed OB, Asghar AH, Elhassan MM. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *African Journal of Microbiology Research*. 8(6):598-602.
- [19] Hidayani AA, Tassakka AC, Parenrengi A. 2016. Isolation and characterization of an envelope protein (VP19) of a White Spot Syndrome Virus from diseased vannamei (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*. 9(2):389-95.
- [20] Riahi M, Babaei M, Ghahremaninejad F. 2019. Genomic DNA Isolation From Scrophulariaceae Dried Leaves Using A Simple, High-Throughput Protocol. *Bangladesh Journal Of Botany*. 48(4):1231-5.
- [21] Safitri R, Muchlissin SI, Mukaromah AH, Darmawati S, Ethica SN. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus Thuringiensis* Irodi Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. InProsiding Seminar Nasional & Internasional (Vol. 1, No. 1).
- [22] Shi R, Lewis RS, Panthee DR. 2018. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *Plos one*. 13(12):e0203011.
- [23] Cheng HR, Jiang N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology letters* 28(1):55-9.

- [24] Esser KH, Marx WH, Lisowsky T. 2006. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature methods*. 3(1):i-i.
- [25] Melzak KA, Sherwood CS, Turner RF, Haynes CA. 1996. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of colloid and interface science*. 181(2):635-44.
- [26] Radji M. 2006. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Edisi ke 2. Departemen Farmasi FMIPA-UI. hal15-43.