

## Perbandingan Isolasi DNA Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode *Heat Treatment* dan *Filter Based Kit* Berdasarkan Nilai *Limit of Detection* dan *Limit of Quantification*

Brilliant Nur Muhammad, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah\*  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Salah satu metode isolasi DNA yang sederhana dan cepat adalah dengan metode pemanasan (*heat treatment*). Namun belum diketahui apakah metode tersebut memiliki hasil yang sama baiknya seperti metode *filter based kit* yang sudah umum digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan metode isolasi DNA antara *heat treatment* dengan *filter based kit* yang didasarkan pada *limit of detection (LOD)* dan *limit of quantification (LOQ)* yang didapat dari perhitungan *yield* pada bakteri *E. coli*.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Konsentrasi bakteri *E. coli* digunakan sebagai sampel diambil menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu pada konsentrasi  $10^1 - 10^4$  CFU/ml. Metode *heat treatment* dan metode *filter based kit* adalah metode isolasi DNA yang diuji dalam penelitian ini. Analisa data menggunakan uji ANOVA dan dilakukan uji *Least Significant Difference (LSD)*.

**Hasil:** *Yield heat treatment* berbeda dengan kontrol pada konsentrasi 10.000 CFU/ml ( $p=0.000$ ), dan 1000 CFU/ml ( $p=0.002$ ). Sedangkan pada *filter based kit* konsentrasi 10.000 CFU/ml ( $p=0.003$ ), 1000 CFU/ml ( $p=0.009$ ) dan 100 CFU/ml ( $p=0.033$ ). Nilai kemurnian pada metode *heat treatment* dan *filter based kit* tidak ada yang mencapai angka 1.7-2.0. *LOD heat treatment* adalah 2,39 ng/ $\mu$ l, sedangkan *filter based kit* adalah 4,06 ng/ $\mu$ l. *LOQ heat treatment* adalah 6, 43 ng/ $\mu$ l, sedangkan *filter based kit* adalah 8, 10 ng/ $\mu$ l.

**Kesimpulan:** Berdasarkan *limit of detection*, metode *heat treatment* memiliki konsentrasi bakteri minimum 1000 CFU/ml. Sedangkan metode *filter based kit* memiliki konsentrasi minimum 10 CFU/ml. Dari perbandingan metode, metode *filter based kit* memiliki *yield* yang lebih tinggi dari metode *heat treatment*.

**Kata Kunci :** isolasi DNA, *heat treatment*, *filter based kit*, *Escherichia coli*.

Korespondensi:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail:riorisandiansyah@unisma.ac.id

## The Comparison of *Escherichia coli* DNA Isolation Between Heat Treatment and Filter Based Kit Method Based on Limit of Detection and Limit of Quantification

Brilliant Nur Muhammad, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah\*  
Faculty of Medicine, Malang Islamic University

### ABSTRACT

**Introduction:** One simple and rapid DNA isolation method is by heat treatment. However, it unknown whether the result of this method has the same quality compared to the more commonly used filter based kit. This research aims compare heat treatment and filter based kit DNA isolation methods based on its limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) from DNA isolation yield from *E. coli*.

**Method:** This research is an *in vitro* laboratory experimental research method. The *E. coli* concentration in this study is obtained through purposive sampling with a concentration of  $10^1 - 10^4$  CFU/ml. Heat treatment and filter based kit method are DNA isolation methods used in this study. The data analysis uses ANOVA and Least Significant Difference (LSD) test.

**Result:** Optimal yield of heat treatment method was found at a bacterial concentration of 10.000 CFU/ml ( $p=0.000$ ) and 1000 CFU/ml ( $p=0.002$ ). While the optimal yield of filter based kit was found at 10.000 CFU/ml ( $p=0.003$ ), 1000 CFU/ml ( $p=0.009$ ) and 100 CFU/ml ( $p=0.033$ ). The purity value of both heat treatment and filter based kit method did not reach 1.7-2.0. The heat treatment's LOD was 2,39 ng/ $\mu$ l, while the filter based kit's LOD was 4,06 ng/ $\mu$ l. The heat treatment's LOQ was 6, 43 ng/ $\mu$ l, while the filter based kit's LOQ was 8, 10 ng/ $\mu$ l.

**Conclusion:** According to limit of detection, the heat treatment method has the minimum bacterial concentration of 1000 CFU/ml. Whereas, the filter based kit method has the minimum bacterial concentration of 10 CFU/ml. Based on the method comparison, filter based kit method has higher yield than heat treatment method.

**Keyword:** DNA isolation, heat treatment, filter based kit, *Escherichia coli*

Corresponding:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail:riorisandiansyah@unisma.ac.id

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan tingkat infeksi bakteri yang tinggi. Bakteri penginfeksi manusia antara lain berasal dari famili *enterobacteriaceae* yaitu bakteri *E. coli*. Pada kasus-kasus infeksi berat yang disebabkan bakteri *E. coli* seperti pada insiden sepsis yang sudah mengalami peningkatan dengan angka kematian yang terus bertambah. Setiap tahun diperkirakan 400.000-500.000 pasien mengalami sepsis di Eropa dan Amerika Serikat<sup>1</sup>. Metode diagnostik yang tepat dan efisien dapat mencegah pasien mengalami sepsis yang disebabkan oleh bermacam-macam jenis mikroorganisme penginfeksi<sup>2</sup>.

Salah satu metode diagnosis adalah metode deteksi berbasis DNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. metode ini dikenal dengan nilai sensitifitas yang tinggi hingga mencapai angka 92% keakuratannya<sup>3</sup>. Berkat metode *PCR*, agen penginfeksi yang bersifat patogen seperti beberapa jenis bakteri *E. coli* berhasil diidentifikasi dengan cara mengekstraksi asam nukleat dan mendeteksi sekuen asam nukleat spesifik dari materi genetik bakteri<sup>5</sup>. Metode *PCR* membutuhkan isolat DNA sebagai bahan untuk deteksi karena *PCR* merupakan metode deteksi berbasis DNA yang membutuhkan DNA murni. Tentunya kualitas dan kuantitas isolat DNA yang digunakan sebagai bahan harus baik. Isolat DNA dapat dikatakan baik apabila bernilai 10-100 ng/ $\mu$ l.

Isolasi DNA pada prinsipnya adalah mengambil DNA secara murni dengan cara menghilangkan komponen-komponen selain DNA. Metode isolasi DNA yang sudah dikenal adalah metode dengan kit komersial yaitu dengan *filter based kit*. Prinsip metode *filter based kit* yaitu menggunakan filter untuk menangkap DNA dan membuang komponen sel bakteri selain DNA<sup>6</sup>.

Penyederhanaan dari metode isolasi DNA adalah metode *heat treatment*. Metode ini menggunakan konsep *thermal lysis* dengan memanaskan bakteri pada air dengan suhu 100°C sehingga dinding bakteri akan *lysis* karena mengalami disintegrasi dan mengakibatkan komponen sel beserta DNA akan terlepas<sup>7</sup>. Metode ini memiliki keunggulan seperti langkah-langkah yang dilakukan lebih sederhana dan waktu pengerjaan yang tidak lebih dari 2 jam. Waktu pengerjaan metode ini lebih cepat dari metode *filter based kit*. Karena metode ini tidak melibatkan proses penghilangan komponen bakteri dan pemurnian DNA bakteri.

*E. coli* memiliki karakteristik berbentuk basil dan jenis gram negatif. Bentuk basil memiliki luas permukaan yang lebih luas dibandingkan bentuk *Coccus*. Jenis bakteri gram negatif memiliki lapisan dinding sel yang lebih tipis yaitu (10 nm) dari pada bakteri gram positif yaitu (20-80 nm). Namun bakteri *E. coli* sebagai gram negatif memiliki struktur dinding yang lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif. Dinding bakteri *E. coli* tersusun

atas membran luar, peptidoglikan dan membran dalam<sup>8</sup>.

Kualitas isolasi DNA bakteri dipengaruhi oleh karakteristik jenis bakteri dan jumlah bakteri. Maka penelitian mengenai metode isolasi DNA baru perlu dilakukan untuk mengetahui metode deteksi berbasis DNA yang lebih sederhana dan murah sekaligus menghasilkan isolat DNA dengan *yield* dan kemurnian yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji metode *heat treatment* karena metode ini memiliki langkah-langkah yang lebih sederhana, biaya yang murah, alat yang dibutuhkan sedikit, dan waktu pengerjaan yang lebih cepat dari metode *filter based kit*.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan desain penelitian secara analitik kuantitatif yang dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. Pelaksanaan penelitian ini dimulai dari bulan desember 2019 hingga April 2020.

### Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *E. coli* sebagai sampel dan menggunakan teknik *purposive sampling*. Metode isolasi DNA *heat treatment* dan metode isolasi DNA *filter based kit* adalah metode isolasi DNA yang diuji dalam penelitian ini.

### Inokulasi Bakteri

Bakteri *E. coli* diambil menggunakan *oshe* dengan jumlah tiga *oshe* dari stok media padat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran FK UNISMA. Bakteri kemudian ditumbuhkan ke stok media cair *Nutrient Broth* yang terdiri dari *beef extract* 3 g/L, NaCl 5 g/L dan *peptone* 10 g/L. Bakteri disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-20 jam hingga media keruh. Hasil dari media cair (*Nutrient broth*) dibiakkan dalam cawan petri yang berisi media padat *Nutient agar* yang terdiri *beef extract* 10 g/L, *peptone* 10 g/L, NaCl 5 g/L, dan agar 15 g/L. Setelah itu bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml *normal saline* lalu dihomogenkan.

### Perhitungan bakteri

Bakteri diencerkan dengan *normal saline* dengan cara menyiapkan 12 *tube* berisi *normal saline* sebanyak 1.350  $\mu$ l. Selanjutnya stok yang berisi 20ml *normal saline* diambil sebanyak 150  $\mu$ l dan diencerkan pada setiap tabung reaksi mulai dari pengenceran  $10^{-1}$  sampai pada pengenceran  $10^{-12}$ . disiapkan juga satu kontrol yang berisi *normal saline* tanpa mengandung bakteri. Bakteri dihitung menggunakan dua metode, metode pertama perhitungan secara *indirect* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 600 nm. Kedua, perhitungan menggunakan metode *total plate count (TPC)* dengan menginokulasi

bakteri pada media NA yang telah dibagi menjadi 8 bagian berdasarkan pengenceran  $10^{-5}$ - $10^{-12}$ .

Masing-masing bagian diteteskan sesuai dengan tingkat pengencerannya sebanyak 10  $\mu$ l cairan *normal saline* yang berisi bakteri *E. coli*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-20 jam. Setelah diinkubasi, bakteri *E. coli* akan tumbuh dan membentuk koloni. Jumlah koloni tersebut dihitung menggunakan *colony counter* berdasarkan daerah pengenceran yang sudah ditentukan.

#### **Isolasi DNA Bakteri Menggunakan Metode Heat Treatment**

Bakteri dengan jumlah 5 *oshe* diambil dari stok yang berisi bakteri *E. coli* sebanyak 100.000 CFU/ml kemudian dilarutkan dengan *normal saline*, *normal saline* berfungsi sebagai media untuk bakteri *E. coli*. Bakteri selanjutnya diencerkan sebanyak 4 kali yaitu pada konsentrasi 10.000 CFU/ml sampai dengan 10 CFU/ml pada *tube*. Bakteri yang sudah diencerkan kemudian di panaskan dengan aquades bersuhu 100°C selama 10 menit. Bakteri disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Bakteri kemudian diberi larutan *DNA solution rehydration*, dan di teteskan pada nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA dari bakteri yang sudah diisolasi.

#### **Isolasi DNA Bakteri menggunakan metode Filter Based Kit**

Bakteri dengan jumlah 5 *oshe* diambil dari stok yang berisi bakteri *E. coli* sebanyak 100.000 CFU/ml kemudian dilarutkan dengan *normal saline*, *normal saline* berfungsi sebagai media untuk bakteri *E. coli*. Bakteri diencerkan sebanyak 4 kali yaitu pada konsentrasi 10.000 CFU/ml sampai dengan 10 CFU/ml pada *tube*. Bakteri di sentrifugasi selama 1 menit pada putaran maksimum dan supernatannya di buang. Pellet dicampurkan dengan 100  $\mu$ l *buffer EL* dan diinkubasi selama 10-60 menit pada suhu 37 °C. *Tube* ditambahkan 100  $\mu$ l *RS buffer*, 10  $\mu$ l larutan PK dicampur rata dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 56°C, setelah itu ditambahkan 200  $\mu$ l *buffer GA* dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000 x g. Supernatan dipindahkan ke *tube* baru dan tambahkan 400  $\mu$ l *buffer BA* dan dicampur rata, supernatan dipindahkan lagi ke *spin column* dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. 500  $\mu$ l *buffer G* ditambahkan ke *spin column* dan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit.

500  $\mu$ l *washing buffer* ditambahkan pada *spin column* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit setelah itu dibuang cairannya dan langkah ini diulangi sebanyak 2x. Sentrifugasi lagi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit dan setelah itu *spin column*nya dipindahkan ke *tube* baru yang steril. 100  $\mu$ l *elution buffer* ditambahkan dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan. Disentrifugasi lagi pada kecepatan 1.000 x g selama 1 menit dan lepas *spin column* dari

*tube*. *Tube* tersebut berisi DNA yang sudah terfilter dan siap di lihat kemurnian dan hasilnya pada nanodrop.

#### **Pengukuran Yield dan Kemurnian**

Hasil uji isolasi DNA pada metode *heat treatment* dan *filter based kit* kemudian diukur menggunakan nanodrop pada  $\lambda = 230, 260, \text{ dan } 280$  nm yang diulang 3 kali. Hasil nilai *yield* dikatakan baik apabila berbeda signifikan dengan kontrol dan melebihi *limit of detection*. Sedangkan untuk kemurnian dikatakan baik apabila nilainya sebesar 1,7-2,0<sup>9</sup>.

#### **Perhitungan Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)**

Perhitungan *LOD* dan *LOQ* didapatkan dari hasil *yield* isolasi DNA. Menurut pedoman validasi metode oleh pusat kimia LIPI, jika kegiatan analisis dilakukan menggunakan alat/instrumen maka limit deteksi dan kuantisasi ditentukan dengan mengukur respon blanko, selanjutnya ditentukan simpangan baku/standar deviasi dari perhitungan rata-rata analisa hasil. Berdasarkan pedoman validasi metode oleh pusat kimia LIPI<sup>11</sup>, nilai limit deteksi dan kuantisasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$LOD = A + 3 SD$$

$$LOQ = A + 10 SD$$

Keterangan:

LOD = Limit Deteksi

LOQ = Limit Kuantisasi

A = Nilai rata-rata hasil analisis blanko

SD = Standar Deviasi (simpangan baku) hasil analisis blanko

#### **Teknik Analisa Data**

Pengujian hipotesis dilakukan dengan menggunakan metode uji *One Way Analysis Of Varians* (ANOVA) dengan cara membandingkan masing-masing konsentrasi berdasarkan hasil yang didapat. Apabila  $p < 0,05$  maka hasil signifikan dan perlu dilakukan uji lanjut yaitu *post hoc test* untuk mengetahui bagaimana struktur perbedaan antar perlakuan. Uji lanjut yang dilakukan adalah uji *Least Significance Different (LSD)* untuk menentukan ada tidaknya perbedaan pada setiap perlakuan. Program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) version 22.0 digunakan untuk uji statistik.

## **HASIL DAN ANALISA DATA**

#### **Jumlah Koloni Total Plate Count Bakteri E. coli**

Bakteri diencerkan sampai pengenceran  $10^{-12}$  pada *tube* yang berisi *normal saline*. Kemudian bakteri dihitung menggunakan metode *total plate count* (TPC) dengan menginokulasi bakteri pada media *nutrient agar* (NA). Metode TPC dilakukan pada cawan petri pada tiga *batch* bakteri *E. coli* dengan pengenceran  $10^{-5}$  sampai dengan  $10^{-12}$ . Masing-masing *batch* dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Tabel 1.1 Jumlah Koloni *E. coli*

Batch	10 <sup>-5</sup> CFU/ml	10 <sup>-6</sup> CFU/ml	10 <sup>-7</sup> CFU/ml	10 <sup>-8</sup> CFU/ml	10 <sup>-9</sup> CFU/ml	10 <sup>-10</sup> CFU/ml	10 <sup>-11</sup> CFU/ml	10 <sup>-12</sup> CFU/ml	Absorban si 600nm
1	3,33±1,52	0,33±0,57	0	0	0	0	0	0	0,077
2	8,33±0,57	0,66±0,57	0,66±0,57	0	0	0	0	0	0,308
3	5±1	0,33±0,57	0	0	0	0	0	0	0,353

**Keterangan:** Data jumlah koloni bakteri *E. coli* dalam rata-rata ± standar deviasi

Batch pertama menunjukkan pada pengenceran 10<sup>-7</sup>-10<sup>-12</sup> sudah tidak terlihat koloni bakteri *E. coli*. Batch kedua menunjukkan pada pengenceran 10<sup>-8</sup>-10<sup>-12</sup> sudah tidak terlihat koloni bakteri *E. coli*. Batch ketiga menunjukkan pada pengenceran 10<sup>-7</sup>-10<sup>-12</sup> sudah tidak terlihat koloni bakteri *E. coli*. Koloni bakteri dihitung pada pengenceran 10<sup>-5</sup>.

Perhitungan dilakukan secara *indirect* menggunakan spektrofotometer pada setiap tabung reaksi dengan  $\lambda=600$  nm. Perhitungan bakteri menggunakan spektrofotometer bertujuan untuk mengkonfirmasi jumlah stok bakteri apabila perlu dilakukan pengulangan *TPC*.

#### Perbandingan Yield dan Kemurnian Metode Heat Treatment dan Filter Based Kit

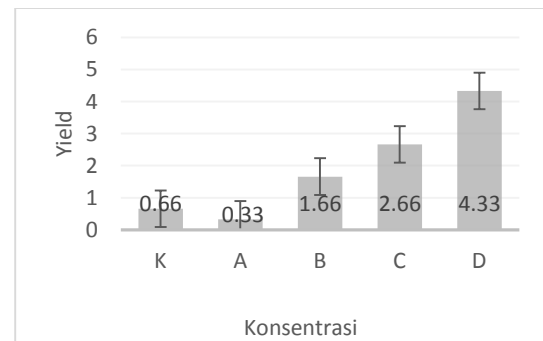
DNA bakteri yang sudah diisolasi menggunakan metode *heat treatment* kemudian di teteskan pada nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian dari DNA bakteri yang sudah diisolasi.

Table 1.2 Yield dan Kemurnian Metode Heat Treatment

Konsentrasi Bakteri (CFU/ml)	Mean Yield (CFU/ml)	Mean Kemurnian (CFU/ml)
10.000	4,33±0,58	4,33±0,58
1000	2,66±0,58	-
100	1,66±0,58	-
10	0,33±0,58	-
Kontrol	0,66±0,58	-

SD=Standar Deviasi

Pada kontrol dan pada konsentrasi 10-1000 CFU/ml nilai kemurnian tidak muncul pada nanodrop, kemudian pada konsentrasi 10.000 CFU/ml diperoleh hasil rata-rata sebesar 4,33 dengan standar deviasi kemurnian sebesar 0,58.



**Gambar 1.1 Histogram Yield Metode Heat Treatment**

**Keterangan:** K= kontrol A=10 CFU/ml B=100 CFU/ml C=1000 CFU/ml D=10.000 CFU/ml

Hasil uji statistik pada konsentrasi 10.000 CFU/ml (D) ditunjukkan dengan simbol (k), (a), (b), dan (c) yang bermakna berbeda signifikan dengan kontrol (k) ( $p=0.000$ ), konsentrasi 10 CFU/ml (a) ( $p=0.000$ ), konsentrasi 100 CFU/ml ( $p=0.000$ ), dan konsentrasi 1000 CFU/ml ( $p=0.005$ ). pada konsentrasi 1000 CFU/ml (C) ditunjukkan dengan simbol (k) dan (a) yang bermakna berbeda signifikan dengan kontrol (k) ( $p=0.002$ ) dan konsentrasi 10 CFU/ml ( $p=0.001$ ). Pada konsentrasi 100 CFU/ml (B) ditunjukkan dengan simbol (a) yang bermakna berbeda signifikan dengan konsentrasi 10 CFU/ml (a) ( $p=0.018$ ).

#### Hasil Nanodrop Metode Filter Based Kit

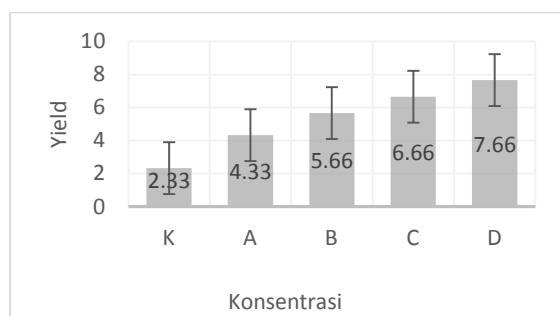
DNA bakteri yang sudah diisolasi menggunakan metode *filter based kit* kemudian di teteskan pada nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian dari DNA bakteri yang sudah diisolasi.

**Table 1.3 Yield dan Kemurnian Metode Filter Based Kit**

Konsentrasi Bakteri (CFU/ml)	Mean Yield	Mean Kemurnian
10.000	7,66±1,52	-7,66±1,52
1000	6,66±1,52	-0,16±7,11
100	5,66±2,51	0,83±2,84
10	4,33±1,52	-2,66±1,52
Kontrol	2,33±0,57	0,66±1,15

SD=Standar Deviasi

Hasil kemurnian rata-rata pada kontrol sebesar 0,66. Kemudian terjadi penurunan pada konsentrasi 10 CFU/ml dengan angka rata-rata kemurnian sebesar -2,66. Setelah itu terjadi peningkatan pada 100 CFU/ml dengan angka rata-rata kemurnian sebesar 0,83. terjadi penurunan kembali pada 1000 CFU/ml dengan angka rata-rata kemurnian sebesar -1,66 dan pada 10.000 CFU/ml dengan angka rata-rata sebesar -7,66.



**Gambar 1.2 Histogram Yield Metode Filter Based Kit**

**Keterangan:** K=kontrol A= 10 CFU/ml B=100 CFU/ml C= 1000 CFU/ml D=10.000 CFU/ml

Hasil uji statistik pada konsentrasi 10.000 CFU/ml (D) ditunjukkan dengan simbol (k) dan (a) yang bermakna berbeda signifikan dengan kontrol (k) ( $p=0.003$ ) dan konsentrasi 10 CFU/ml (a) ( $p=0.033$ ). Pada konsentrasi 1000 CFU/ml (C) ditunjukkan dengan simbol (k) yang bermakna berbeda signifikan dengan kontrol (k) ( $p=0.009$ ). Pada konsentrasi 100 CFU/ml (B) ditunjukkan dengan simbol (k) yang bermakna berbeda signifikan dengan kontrol (k) ( $p=0.033$ ).

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

Perhitungan *limit of detection* metode *heat treatment* dengan rumus  $(A+3 SD) = (\text{rata-rata kontrol}+3 \times \text{standar deviasi})$  dari rumus tersebut dimasukkan angka  $(0.66+3 \times 0.58)$  dan diperoleh hasil sebesar 2,39 ng/ $\mu$ l. Perhitungan *limit of detection* metode *filter based kit* dengan rumus  $(A+3 SD) = (\text{rata-rata kontrol}+3 \times \text{standar deviasi})$  dari rumus tersebut dimasukkan angka  $(2.33+3 \times 0.58)$  dan diperoleh hasil sebesar 4,06 ng/ $\mu$ l.

#### **5.4 Perhitungan LOQ Metode Heat Treatment dan Metode Filter Based Kit**

Nilai perhitungan nilai *limit of quantification* metode *heat treatment* dengan rumus  $(A+10 SD) = (\text{rata-rata kontrol}+10 \times \text{standar deviasi})$  dari rumus tersebut dimasukkan angka  $(0.66+10 \times 0.58)$  dan diperoleh hasil sebesar 6.43 ng/ $\mu$ l. Nilai perhitungan nilai *limit of quantification* metode *filter based kit* dengan rumus  $(A+10 SD) = (\text{rata-rata kontrol}+10 \times \text{standar deviasi})$  dari rumus tersebut dimasukkan angka  $(2.33+10 \times 0.58)$  dan diperoleh hasil sebesar 8.10 ng/ $\mu$ l.

## **PEMBAHASAN**

### **Jumlah Koloni Total Plate Count Bakteri E. Coli**

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli*, dengan karakteristik yang dimilikinya, bakteri *E. coli* dapat merepresentasikan kelompok bakteri Gram negatif bentuk basil. Media yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *normal saline*. Penggunaan *normal saline* bertujuan sebagai media tanpa bias untuk bakteri *E. coli* karena mengandung NaCl fisiologis, penggunaan media lain seperti darah tidak dilakukan pada penelitian ini untuk menghindari bias karena pengaruh kontaminasi komponen darah seperti plasma, sel darah merah, sel darah putih dan komponen darah lainnya<sup>10</sup>.

Tujuan dari perhitungan menggunakan metode *total plate count (TPC)* adalah untuk menghitung sel bakteri yang hidup. Pada penelitian ini pengenceran bakteri *E. coli* dilakukan 12 kali sampai pengenceran  $10^{-12}$  pada *tube*. Pengenceran ini bertujuan untuk mengetahui sampai pengenceran mana jumlah koloni dapat dihitung karena sesuai prinsip faktor pengenceran, yang mana semakin tinggi faktor pengenceran maka semakin rendah jumlah koloni mikroba<sup>11</sup>. Kemudian setelah diencerkan sampai 12 kali, *tube* dengan pengenceran  $10^{-5}$  sampai  $10^{-12}$  diteteskan pada cawan petri yang sudah dibagi berdasarkan tingkat pengenceran. Pada penelitian ini 5 oshe bakteri yang dilarutkan pada 20ml NS pada sampel pertama terdapat  $10^6$  CFU/ml. pada sampel kedua terdapat  $10^7$  CFU/ml. pada sampel ketiga terdapat  $10^6$  CFU/ml. Menurut standar *bacteriological analytic manual pada tahun 1998*<sup>12</sup> jumlah bakteri yang dapat dihitung tidak lebih dari  $300 \times 10^5$  CFU/ml. Jika lebih dari nilai tersebut akan masuk kategori terlalu banyak untuk dihitung (TBUD).

Pada pengenceran  $10^{-5}$  digunakan sebagai batas minimum pengenceran karena pada penelitian ini jumlah koloni yang masih dapat dihitung terletak pada pengenceran  $10^{-5}$ . Sesuai hasil analisa data *total plate count* pada penelitian ini diperoleh hasil pada pengenceran  $10^{-5}$  didapatkan jumlah bakteri pada sampel pertama sebesar  $3,33 \times 10^5$  CFU/ml, pada sampel kedua sebesar  $8,33 \times 10^5$  CFU/ml, dan pada sampel ketiga sebesar  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Jumlah

bakteri yang didapatkan pada *TPC* sudah memenuhi standar (*bacteriological analytic manual, 1998*)<sup>12</sup> yaitu tidak lebih dari  $300 \times 10^5$  *CFU/ml*.

### Perhitungan spektrofotometri

Pada penelitian ini dilakukan juga spektrofotometri pada ketiga sampel untuk menghitung jumlah semua sel bakteri yang mati atau hidup. Metode perhitungan menggunakan spektrofotometri merupakan metode perhitungan mikroorganisme yang menggunakan prinsip kekeruhan. Semakin banyak suatu mikroorganisme pada sampel maka sampel tersebut akan menjadi semakin keruh, kekeruhan dapat dideteksi menggunakan absorbansi gelombang cahaya pada spektrofotometer<sup>13</sup>.

Pada penelitian ini sampel yang sudah dimasukkan pada spektrofotometer akan dipancarkan cahaya dengan panjang gelombang 600nm, dimana panjang gelombang ini termasuk dalam rentang panjang gelombang yang bisa digunakan untuk menembus partikel untuk mengetahui konsentrasi sel yang ada didalam sampel. Cahaya yang terhalang oleh mikroorganisme akan dibaca sebagai absorbansi<sup>14</sup>. Pada penelitian ini absorbansi yang diperoleh pada sampel pertama sebesar 0,077, sampel kedua sebesar 0,308, dan sampel ketiga sebesar 0,353. Berdasarkan hukum lambert Beer nilai absorbansi yang baik adalah berkisar antara 0,2-0,8 dan nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi.

## HASIL PERBANDINGAN YIELD METODE HEAT TREATMENT DAN METODE FILTER BASED KIT

### Yield Metode Heat Treatment

*Yield* uji isolasi DNA metode *heat treatment* pada penelitian ini ditunjukkan oleh angka yang keluar pada kolom *concentration* nanodrop. Nilai *yield* yang diperoleh pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* dan konsentrasi 1000 *CFU/ml* berbeda signifikan dengan kontrol. Nilai *yield* yang diperoleh pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* dan konsentrasi 1000 *CFU/ml* juga sudah melebihi *limit of detection* sebesar 2,39 ng/ $\mu$ l. Menurut uji statistik hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* sampai dengan konsentrasi 1000 *CFU/ml* merupakan tingkat konsentrasi yang optimal terhadap *yield* uji isolasi DNA metode *heat treatment*. Perbedaan nilai *yield* tersebut sebanding dengan tingkat konsentrasinya. Hal ini mengindikasikan pada metode *heat treatment*, jumlah minimal bakteri yang diperlukan untuk isolasi DNA secara akurat adalah 1000 *CFU/ml*. tetapi jika dibandingkan dengan *yield* metode *filter based kit*, *yield* metode *heat treatment* mempunyai nilai yang lebih rendah. Hal ini dikarenakan tidak ditambahkan buffer lisis yang berfungsi untuk memecahkan dinding sel bakteri saat proses pemanasan pada suhu 100°C<sup>15</sup>. Proses pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit juga

menyebabkan DNA menjadi rusak. Hal ini dikarenakan paparan suhu 100°C tidak hanya merusak dinding sel saja tetapi juga merusak struktur DNA bakteri *E. coli* sehingga konsentrasi DNA yang dihasilkan rendah<sup>16</sup>.

### Kemurnian Metode Heat Treatment

Nilai kemurnian metode *heat treatment* yang ditunjukkan pada kolom (A260/A280) tidak menunjukkan angka kemurnian dan baru bisa dideteksi pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* dengan nilai kemurnian 4,33. Kemurnian dikatakan baik apabila berkisar pada angka 1,7-2,0<sup>9</sup>. Namun pada penelitian ini menunjukkan angka kemurnian metode *heat treatment* pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* diatas 2,0, hal ini disebabkan DNA yang terkontaminasi oleh RNA. Karena pada metode *heat treatment* memotong proses isolasi dengan tidak melakukan tahap penghilangan komponen sel selain DNA dan tahap pemurnian DNA<sup>17</sup>. Sedangkan tidak munculnya angka kemurnian pada kontrol dan konsentrasi konsentrasi 10 *CFU/ml* - konsentrasi 1000 *CFU/ml* disebabkan karena terlalu pekatnya kontaminan dan sensitifitas nanodrop tidak bisa kuantifikasi DNA pada konsentrasi rendah<sup>9</sup>.

Karakteristik bakteri *E. coli* sebagai bakteri Gram negatif juga mempengaruhi nilai *yield* dan kemurnian yang dihasilkan metode *heat treatment*. Beberapa komponen sel bakteri *E. coli* yang mempengaruhi proses isolasi DNA metode *heat treatment* yaitu membran luar yang dapat membentuk lapisan yang terdiri dari lipopolisakarida, fosfolipid, dan lipoprotein. Lapisan tersebut berfungsi untuk melindungi bakteri dari pengaruh lingkungan termasuk suhu yang meningkat pada saat proses pemanasan pada suhu 100°C<sup>18</sup>. Sitoplasma bakteri *E. coli* juga dapat mempengaruhi kemurnian karena fungsinya yang mampu melindungi DNA. Sehingga DNA dapat bertahan pada nuklei dan saat keadaan kurang baik. Seperti suhu yang ekstrem dan suasana yang terlalu asam atau basa<sup>19</sup>.

### Yield Metode Filter Based Kit

Uji isolasi DNA metode *filter based kit* pada nilai *yield* yang ditunjukkan oleh angka pada kolom *concentration* nanodrop. Pada penelitian ini diperoleh hasil pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml*, 1000 *CFU/ml*, dan 100 *CFU/ml* berbeda signifikan terhadap kontrol. Nilai konsentrasi yang diperoleh pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml*, 1000 *CFU/ml*, dan 100 *CFU/ml* dan 10 *CFU/ml* juga sudah melebihi *limit of detection* sebesar 4,06 ng/ $\mu$ l. Menurut uji statistik hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 10.000 *CFU/ml* sampai dengan 100 *CFU/ml* merupakan tingkat konsentrasi yang optimal terhadap *yield* uji isolasi DNA metode *filter based kit*. Nilai *yield* pada konsentrasi 10 *CFU/ml* sudah berada diatas nilai *LOD*. Walaupun berdasarkan uji statistik nilai *yield* pada konsentrasi

10 CFU/ml masih tidak optimal. Dapat disimpulkan pada metode *filter based kit*, jumlah minimal bakteri yang diperlukan untuk isolasi DNA secara akurat adalah 10 CFU/ml.

Pada analisa data, perbandingan *yield* metode *heat treatment* dengan *filter based kit* menunjukkan bahwa nilai konsentrasi pada metode *filter based kit* lebih tinggi pada setiap konsentrasi. Nilai konsentrasi pada metode *filter based kit* juga termasuk dalam kategori tinggi karena nanodrop dapat mendeteksi kemurnian sampai konsentrasi 10 CFU/ml. Hal ini disebabkan perbedaan langkah-langkah isolasi DNA, metode *filter based kit* memiliki langkah yang lebih kompleks daripada metode *heat treatment* karena metode *filter based kit* melakukan tahap-isolasi DNA dengan lengkap seperti pelisisan dinding sel, penghilangan komponen sel selain DNA, dan pemurnian DNA<sup>6</sup>.

Saat tahap pelisisan dinding sel bakteri *E. coli* pada metode *filter based kit* menggunakan *buffer EL* sebagai agen pelisis sel sehingga dinding sel dapat lisis. Pada tahap penghilangan komponen sel selain DNA, metode *filter based kit* menggunakan *washing buffer* untuk menghilangkan komponen sel selain DNA dapat terlepas dari nuklei. Pada tahap pemurnian metode *filter based kit* menggunakan *elution buffer* untuk membuang residu dari komponen sel yang masih menempel pada DNA untuk meningkatkan kemurnian DNA<sup>6</sup>.

#### Kemurnian Metode *Filter Based Kit*

Nilai kemurnian metode *filter based kit* yang ditunjukkan pada kolom (A260/A280) pada analisa hasil penelitian ini menunjukkan angka kemurnian pada kontrol dan semua konsentrasi berada dibawah angka 1,7-2,0. Dimana angka tersebut merupakan standar untuk nilai kemurnian yang baik. Rendahnya kemurnian pada metode *filter based kit* disebabkan terkontaminasinya DNA dengan protein dari komponen sel yang masih menempel dengan DNA. Membran luar dan komponen sel bakteri *E. coli* sebagai bakteri Gram negatif juga mempengaruhi kemurnian yang dihasilkan metode *filter based kit* sehingga dapat menurunkan kerja buffer. Rendahnya kemurnian juga disebabkan karena masih ada pelarut yang belum terbuang secara menyeluruh saat pemurnian DNA<sup>20</sup>. Didalam panduan kit isolasi DNA berbasis filter terdapat saran bahwa konsentrasi sampel yang diperlukan sebesar  $10^9$  CFU/ml sampai  $10^{12}$  CFU/ml. namun pada penelitian ini digunakan konsentrasi sebesar  $10^4$  CFU/ml. Konsentrasi tersebut dipilih dengan tujuan untuk mengetahui batas minimum konsentrasi yang diperlukan dalam uji isolasi DNA. Hal ini juga menyebabkan kurang optimalnya nilai kemurnian dan *yield* pada metode *filter based kit* sehingga tidak mencapai *limit of quantification*. Pada analisa data, perbandingan kemurnian metode *heat treatment* dan *filter based*

*kit* menunjukkan tidak ada metode yang menghasilkan nilai kemurnian pada angka 1,7-2,0.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *Limit of detection yield* metode *heat treatment* adalah 2.39 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 1000 CFU/ml dan *limit of detection yield* metode *filter based kit* adalah 4.06 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 10 CFU/ml.
2. *Limit of quantification yield* metode *heat treatment* adalah 6.43 ng/μl dan *limit of quantification yield* metode *filter based kit* adalah 8.10 ng/μl. Konsentrasi *yield* metode *heat treatment* dan metode *filter based kit* tidak ada yang mencapai *limit of quantification*.
3. Metode *filter based kit* memiliki *yield* yang lebih tinggi pada setiap konsentrasi dari metode *heat treatment*. Sedangkan untuk kemurnian, metode *filter based kit* dan *heat treatment* tidak memiliki hasil baik.

#### SARAN

Berdasarkan kelemahan yang ditemukan dalam penelitian, maka perbaikan dari kelemahan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Memastikan ketepatan jumlah reagen dari setiap langkah-langkah metode isolasi DNA.
2. Memastikan higienitas dari alat-alat yang digunakan.
3. Memodifikasi metode *heat treatment* dengan menambahkan proses penghilangan komponen sel dan presipitasi DNA.
4. Menyarankan Penelitian lanjut menggunakan modifikasi *heat treatment* atau menggunakan media darah bertujuan untuk mengetahui efektifitas metode isolasi DNA pada darah yang memiliki kandungan yang beragam.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada IOM dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, serta tim kelompok penelitian yang telah membantu penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks GF, Butel Js, Morse SA. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Alih Bahasa: Mudihardi E. Kurniawan, et al. Jakarta: Salemba Medika.
2. Refdanita, Maksun, Nurgani A, dan P. Endang. 2004. Pola kepekaan bakteri terhadap antibiotika di ruang rawat intensif

- rumah sakit Fatmawati Jakarta Timur tahun 2001-2002. Buku Kesehatan 8: 41-48.
3. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, et al. 2006. *Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. BMC Clin Path J* 6(2):1- 8. (<http://www.biomedcentral.com>.diakses 3 Mei 2020).
  4. Bartlett, J.M.S., Stirling D. 2003. *PCR Protocols Second Edition. Methods in Molecular Biology*
  5. Barnes, R. A. and P. L. White. 2016. *PCR technology for detection of invasive Aspergillosis. Journal of Fungi* 2 (23): 1-9.
  6. AACL Bioflux, 2016, Volume 9, Issue 2. <http://www.bioflux.com.ro/aac> diakses pada 27 april 2020
  7. Martin, N.C. Pirie AA. Ford, L.V. Challaghan, C.L Me Turk, K. Lucy, D and scringer, D.G. 2006 *the use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. Science and justice*, 46 (3);179:184
  8. Cooper TF (2007) *Recombination Speeds Adaptation by Reducing Competition between Beneficial Mutations in Populations of Escherichia coli. PLoS Biol* 5(9): e225. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.005022> 5 diakses 16 april 2020
  9. Neil MO, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, Mc Millan ND. 2011. *Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference Qubit system. J Phys Conference Series*.
  10. Guyton, Hall JE. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Terjemahan). 11 ed. Rachman RY, Hartanto H, Novrianti A, Wulandari N, editors. Jakarta: EGC; 2007. P. 223-231.
  11. Sukmawati., Ratna. & Fahrizal, A. (2018). Analisis Cemarkan Mikroba pada Daging Ayam Broiler di Kota Makassar. *Jurnal Scripta Biologica*, 5(1), 68-71. YULIA “Validasi Metode” Diktat Validasi Metode, Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Bandung, 2010.
  12. Larry Maturin and James T. Peeler, 1998 *bacteriological analytic manual*, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> diakses pada 12 Mei 2020
  13. Goldmann, Emanuelle and Llorence H. Green. 2008. *Practical handbook of microbiology, second edition. florida; CRC Press*
  14. Benson. 2001. *Microbial Application Lab Manual, 8th ed. California: The McGraw-Hill Companies*.
  15. Mulyani, Y., A. Purwanto., I. Nurruhwati. 2011. Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. *Jurnal Akuatika* Vol. II No. 1/Maret Tahun 2011.
  16. Anam, Choirul. 2010. “Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu”. *Jurnal Pertanian MAPETA*. Vol. XII, No. 2, p: 72-144, ISSN : 1411-2817.
  17. Buwono, Ibnu Dewi, dan Rosidah. 2010 Uji sensitifitas metode *one step* dan *nested PCR* terhadap deteksi penyakit KHV pada ikan mas Mas (*Cyprinus carpio L.*). lembaga penelitian dan pengembangan, Universitas Padjadjaran.
  18. Purwoko. T. 2007. *Fisiologi Mikroba* 55-57. Bumi Aksara. Jakarta.
  19. Brown, T. A. 2010. *Gene cloning and DNA analysis. Blackwell Publishing, Oxford*.
  20. Li, X., Kuromi, H, Briggs, L, Green, D.B, Rocha, J.J, Sweeney, S.T, Bullock, S.L. (2010). *Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. EMBO J.* 29(5); 992-1006.