



HOME ANNOUNCEMENTS CURRENT ARCHIVES ABOUT ▾

Search

HOME / ARCHIVES / Vol 9 No 2 (2020): Vol 9 No 02(2020): E-Jurnal Medika Udayana

PUBLISHED: 2020-02-03

ARTICLES

TINGKAT PENGETAHUAN IBU MENGENAI DEMAM BERDARAH DENGUE PADA ANAK DI BANGSAL ANAK RSUP SANGLAH DENPASAR

Ni Wayan Ari Utami, I Made Gede Dwi Lingga Utama

1-8

PDF

Abstract views: 105, PDF downloads: 227

KARAKTERISTIK MAHASISWA FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA DENGAN STRIAE DISTENSIAE PADA TAHUN 2018

Ni Wayan Evita Pradnya Dharmesti, IGAA. Praharsini, IGAA. Elis Indira

9-16

PDF

Abstract views: 220, PDF downloads: 287

GAMBARAN KELUHAN MUSKULOSKELETAL DAN ANALISIS POSTUR TUBUH PADA SISWA PENGGUNA KOMPUTER DI SMK "G", DENPASAR, BALI

Ni Wayan Sintyabudi Kumalapatni, I Made Muliarta, I Made Krisna Dinata

15-20

PDF

Abstract views: 309, PDF downloads: 327

PENGARUH STATUS MEROKOK TERHADAP STATUS KONTROL ASMA PADA PASIEN ASMA DI POLIKLINIK PARU RSUP SANGLAH DENPASAR PADA BULAN AGUSTUS-SEPTEMBER 2015

Purna Asta, Bagus Artana

21-27

PDF

Abstract views: 72, PDF downloads: 376

TINGKAT PENGETAHUAN PENDUDUK USIA LANJUT TENTANG HIPERTENSI DI BANJAR CELUK, DESA CELUK, KECAMATAN SUKAWATI

Nindya Kusuma Mahadewi, I Made Agus Kresna Sucandra, Cynthia Dewi Sinardja

28-35

PDF

Abstract views: 55, PDF downloads: 96

HUBUNGAN RUTINITAS OLAHRAGA DENGAN GANGGUAN MUSKULOSKELETAL PADA PEGAWAI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA

Putu Aksa Viswanatha, I Putu Gede Adiatrnika

36-39

PDF

Abstract views: 93, PDF downloads: 547

GAMBARAN KARAKTERISTIK ANEMIA DEFISIENSI BESI PADA IBU HAMIL DI RSUP SANGLAH TAHUN 2017

Putu Ayu Krisna Cahyaning Putri, A.A Ngurah Subawa, A.A Wiradewi Lestari

40-45

 PDF Abstract views: 81,  PDF downloads: 460**KARAKTERISTIK PASIEN BENDA ASING ESOFAGUS DI RSUP SANGLAH DARI TAHUN 2013-2015**

Putu Gede Agus Surya Mahardika, Agus Rudi Asthuta

46-50

 PDF Abstract views: 237,  PDF downloads: 278**KARAKTERISTIK LOW BACK PAIN PADA PEMERIKSAAN MAGNETIC RESONANCE IMAGING DI RSUP SANGLAH PERIODE JANUARI 2017-DESEMBER 2017**

Putu Gede Wahyu Darmayuda, Putu Patriawan, I Made Dwijaputra Ayusta, Firman Parulian Sitanggang

51-55

 PDF Abstract views: 77,  PDF downloads: 196**KARAKTERISTIK KLINIKOPATOLOGI PASIEN TUMOR KOLOREKTAL YANG MENJALANI BIOPSI KOLONOSKOPI DI RSUP SANGLAH DENPASAR TAHUN 2015-2017**

Putu Julia Chandra Devi, Ni Putu Sriwidayani, Ni Putu Ekawati

56-60

 PDF Abstract views: 59,  PDF downloads: 148**HUBUNGAN KADAR ASAM URAT DALAM DARAH TERHADAP KEPARAHAN PENYAKIT JANTUNG KORONER DI RSUP SANGLAH DENPASAR BALI**

Putu Rarassani, I Nyoman Wiryawan, I Made Putra Swi Antara

61-68

 PDF Abstract views: 12,  PDF downloads: 13**GAMBARAN KEBUGARAN AEROBIK DAN FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHINYA PADA PESERTA SENAM JANTUNG SEHAT USIA 20-40 TAHUN DI KOTA DENPASAR**

Putu Seriari Ambarini, I Putu Adiartha Griadhi, I Dewa Ayu Inten D. P

69-73

 PDF Abstract views: 7,  PDF downloads: 6**KEJADIAN PENURUNAN TAJAM PENGLIHATAN PADA PELAJAR SEKOLAH MENENGAH PERTAMA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS IV DENPASAR SELATAN**

Putu Sindy Reiska Jayanti, Luh Seri Ani, Komang Ayu Kartika Sari

74-79

 PDF Abstract views: 0,  PDF downloads: 0**HUBUNGAN ANTARA POLA MAKAN DENGAN OBESITAS REMAJA PADA SISWA-SISWI SEKOLAH MENENGAH ATAS (SMA) DI DENPASAR**

Nyoman Arya Shridewi Abhigamika, Made Ratna Saraswati

80-86

 PDF Abstract views: 2,  PDF downloads: 1**PREVALENS DAN GAMBARAN KETERLAMBATAN PERKEMBANGAN ANAK DI POLIKLINIK TUMBUH KEMBANG ANAK RSUP SANGLAH**

Ricky Theddy, I Gusti Ayu Trisna Windiani

87-92

 PDF Abstract views: 1,  PDF downloads: 0

AMPLIFIKASI SEKUEN IS6110 DENGAN EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN METODE PEMANASAN (RAPID BOILING) UNTUK IDENTIFIKASI *Mycobacterium tuberculosis*

I Gede Raka Adhyatma, AgussEka Darwinata, MadeeAgus Hendrayana, Ni Nengah Dwi Fatmawati
93-100

PDF

 Abstract views: 1,  PDF downloads: 2

KARAKTERISTIK KLINIKOPATOLOGI PENDERITA ENDOMETRIOSIS DI RSUP SANGLAH DENPASAR TAHUN 2017-2018

Putu Ayu Widya Pramesti, I Gusti Ayu Sri Mahendra Dewi, I Wayan Juli Sumadi, Ni Putu Sriwidyani
100-106

PDF

 Abstract views: 5,  PDF downloads: 5

PREVALENSI RAWAT INAP AKIBAT GEJALA INFEKSI SALURAN PERNAPASAN AKUT (ISPA) PADA BALITA USIA DI BAWAH LIMA TAHUN YANG DITITIPKAN DI TAMAN PENITIPAN ANAK (TPA) KOTA DENPASAR

Alvin Alvelino Putra Sutrisna, Ayu Setyorini Mestika Mayangsari, Eka Gunawijaya
107-111

PDF

 Abstract views: 0,  PDF downloads: 1

[Focus and Scope](#)
[Ethics Statement](#)
[Indexing](#)
[Citedness in Scopus](#)
[Author Guidelines](#)
[Template Article](#)
[Author Fees](#)
[Peer Review Process](#)
[Open Access Policy](#)
[Copyright Notice](#)
[Submissions](#)
[Editorial Teams](#)
[Peer Reviewers](#)
[Register](#)
[Contact](#)



[View My Stats](#)

AMPLIFIKASI SEKUEN IS6110 DENGAN EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN METODE PEMANASAN (*RAPID BOILING*) UNTUK IDENTIFIKASI *Mycobacterium tuberculosis*

I Gede Raka Adhyatma¹, Agus Eka Darwinata², Made Agus Hendrayana², Ni Nengah Dwi Fatmawati²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

e-mail: rakaadhyatma09@gmail.com

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Indonesia merupakan salah satu negara dengan insiden Tuberkulosis tertinggi di dunia. Diagnosis yang cepat dan tepat dapat membantu penanganan dan menuntaskan tuberkulosis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberhasilan dan waktu optimal metode pemanasan (*rapid boiling*) dalam mengekstraksi DNA untuk identifikasi *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental diagnostik yang menggunakan isolat *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dan tiga isolat klinis. Sampel dibagi menjadi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif hasil ekstraksi DNA menggunakan kit komersial dan kelompok perlakuan yaitu pemanasan sampel dengan suhu $100 \pm 1^\circ\text{C}$ berdasarkan waktu: P1 (5 menit), P2 (10 menit), P3 (15 menit) dan P4 (30 menit). Hasil isolasi DNA kemudian diamplifikasi dengan PCR pada sekuen IS6110. Rerata intensitas pita DNA meningkat seiring waktu pemanasan yang meningkat. Pemanasan dengan waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit dan 30 menit secara berurutan memiliki rerata intensitas pita DNA yaitu $12724,35 \pm 4559,64$; $14448,17 \pm 5743,03$; $15398,90 \pm 6355,67$; dan $21199,02 \pm 10385,21$. Berdasarkan uji statistik tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara rerata intensitas pita DNA hasil ekstraksi menggunakan metode pemanasan dibandingkan dengan rerata intensitas pita DNA pada kontrol positif. Metode pemanasan (*rapid boiling*) dengan suhu 100°C dapat digunakan untuk mengekstraksi genom DNA *Mycobacterium tuberculosis* sebagai template PCR untuk amplifikasi sekuen IS6110. Waktu optimal pemanasan adalah 10-30 menit. Penelitian lebih lanjut dengan ukuran sampel yang lebih besar dapat menjadi pengembangan penelitian selanjutnya.

Kata kunci: Amplifikasi Sekuen IS6110, Ekstraksi DNA, Metode Pemanasan, Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by Mycobacterium tuberculosis. Indonesia is one of the countries with the highest Tuberculosis incidence in the world. Rapid and precise diagnosis can help treat tuberculosis. The purpose of this study was to determine the success and optimal time of the rapid boiling method in extracting DNA for identification of Mycobacterium tuberculosis. This research is an experimental study using Mycobacterium tuberculosis H37Rv isolate and three clinical isolates. Samples were divided into negative control groups, positive control groups as a result from DNA extraction using commercial kits and treatment groups, heating the sample with a temperature of $100 \pm 1^\circ\text{C}$ based on time: P1 (5 minutes), P2 (10 minutes), P3 (15 minutes) and P4 (30 minutes). The results of DNA isolation were amplified by PCR in the IS6110 sequence. The average intensity of the DNA band increases with increasing heating time. Heating for 5 minutes, 10 minutes, 15 minutes and 30 minutes respectively has an average intensity of DNA bands namely 12724.35 ± 4559.64 , 14448.17 ± 5743.03 , 15398.90 ± 6355.67 , and 21199.02 ± 10385.21 . Based on statistical tests found no significant differences between the mean intensity of DNA bands extracted using the heating method compared with the average intensity of DNA bands on positive controls. Rapid boiling method with a temperature of 100°C can be used to extract the Mycobacterium tuberculosis DNA genome as a PCR template for IS6110 sequence amplification. The optimal time for heating is 10-30 minutes. Further research with a larger sample size can be a further research development.

Keywords: IS6110 Sequence amplification, DNA Extraction, Heating method, *Mycobacterium tuberculosis* identification.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang mudah menular melalui *droplet* saat batuk, bersin, atau berbicara dan dapat berkomplikasi buruk yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.^{1,2} Tahun 2017, Indonesia juga termasuk dalam 14 negara dengan penyakit TB kompleks tertinggi dengan tiga kriteria TB yaitu kasus TB-HIV tertinggi, kasus *Multidrug-Resistance* TB (MDR-TB) tertinggi dan angka insiden TB per 100.000 penduduk tertinggi di dunia.² MDR-TB dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak sesuai, terapi yang dihentikan sebelum waktunya atau transmisi *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten. Resistensi tersebut juga dapat dipicu akibat diagnosis TB yang inadecuak sehingga penanganan TB tidak sesuai waktu dan dosis seharusnya.³ *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan pemeriksaan TB dengan *rapid testing and detection* TB untuk menegakkan diagnosis sehingga penanganan TB dapat sesuai kebutuhan dan mencegah terjadinya MDR-TB.⁴ Salah satu metode *rapid testing* TB adalah dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri sebagai metode diagnosis yang cepat dan tepat dengan jumlah sampel yang terbatas melalui duplikasi DNA spesifik dengan sensitivitas yang tinggi.⁵ Untuk dapat melakukan PCR diperlukan primer spesifik sebagai *marker* dan ekstraksi genom bakteri yang ingin dideteksi dari suatu isolat. *Insertion sequence 6110* (IS6110) merupakan elemen genetik yang terdapat dalam *M. tuberculosis* yang digunakan sebagai *molecular marker* untuk diagnosis tuberkulosis.⁶

Metode ekstraksi *rapid boiling* atau pemanasan merupakan metode ekstraksi DNA yang sederhana, murah dan cepat. Metode pemanasan ini dapat mengekstraksi DNA bakteri yang memiliki struktur umum Gram positif dan Gram negatif pada suhu tertentu dan terbukti efisien.⁷ Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan dan waktu optimal metode pemanasan (*rapid boiling*) dalam mengekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental diagnostik. Perhitungan sampel berdasarkan rumus Federer untuk pengulangan biologis diperlukan empat sampel bakteri. Sampel pada penelitian ini terdiri dari satu isolat *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dan tiga isolat klinis. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif yaitu bahan amplifikasi tanpa DNA *Mycobacterium*
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>
doi:10.24843.MU.2020.V9.i2.P16

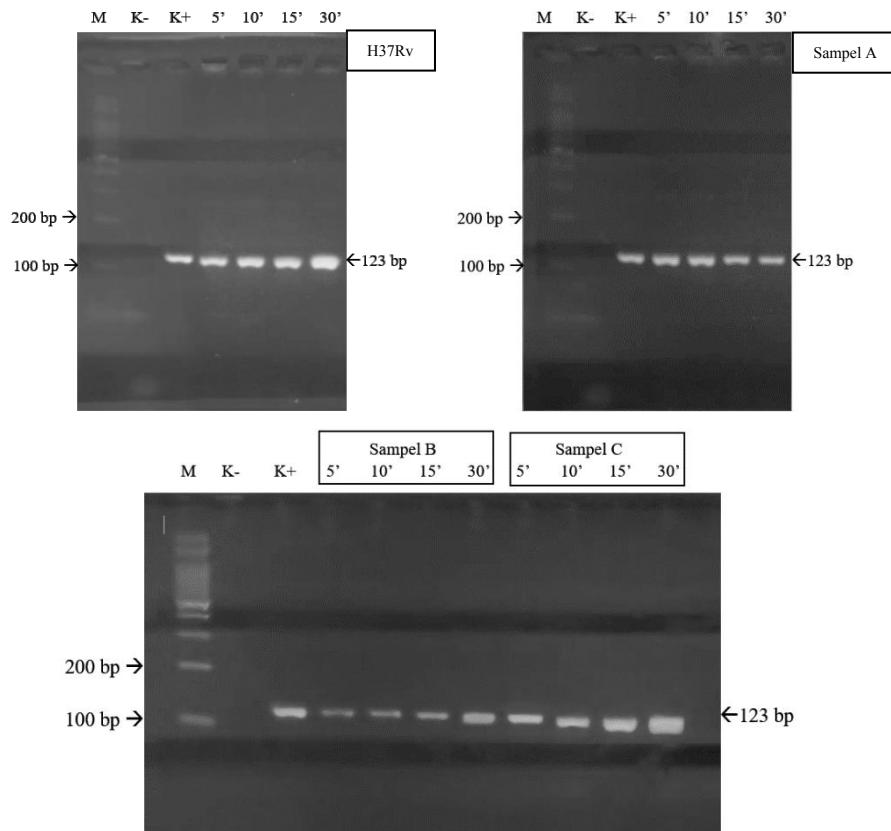
tuberculosis dan kontrol positif yaitu hasil ekstraksi DNA menggunakan kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche®). Kelompok perlakuan (P) terdiri dari kelompok ekstraksi DNA menggunakan metode pemanasan melalui media air suling (*distilled water*) dengan suhu 100°C yang terkonfirmasi dengan termometer raksa berdasarkan waktu P1 (5 menit), P2 (10 menit), P3(15 menit), P4 (30 menit). Keberhasilan metode ini dinilai dengan adanya pita DNA hasil amplifikasi sekuen IS6110 pada gel agarosa yang dikuantifikasi dan dianalisis secara statistik. Isolat bakteri didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah, Denpasar, Bali. Penelitian ini sudah mendapatkan kelaikan etik oleh Komisi Etik Penelitian (KEP) Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan nomor 2019.01.1.0135.

Prosedur penelitian dimulai dari pengambilan sampel hasil kultur di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah, Bali. Isolat tersebut diambil masing – masing dimasukan kedalam tabung steril yang berisi 1 mL akuades hingga konsentrasi bakteri memenuhi standar 0,5 McFarland. Suspensi bakteri dibagi menjadi empat sesuai dengan variabel waktu inkubasi sampel dalam pemanasan 100±1°C masing – masing 200µL. Sampel ditutup rapat dan dibungkus dengan parafilm dan penutup tabung Eppendorf. Ekstraksi DNA dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan metode *snap-chilled*. Prosedur *snap* dilakukan ketika suhu air 100±1°C yang terkonfirmasi dengan termometer raksa, sampel segera dimasukkan kedalam air mendidih sebagai proses pemanasan. Waktu diukur saat sampel sudah masuk kedalam air 100°C. Prosedur dilakukan sama untuk keempat sampel. Prosedur *chilled* dilakukan ketika waktu pemanasan sudah sesuai waktu yang diatur, sampel segera dimasukkan kedalam air es selama 5 – 10 menit. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi pemanjangan waktu pemanasan dan juga agar DNA yang terekstraksi tetap berada diluar sel. Sampel disentrifugasi 5000 rpm selama 15 menit kemudian supernatant dipisahkan dan disimpan dalam suhu -20°C sebagai *template* amplifikasi. Prosedur PCR menggunakan *GoTaq green master mix*® sebagai bahan utamanya. Pasangan primer yang digunakan berdasarkan studi literatur adalah IS6110-Forward (5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'), IS6110-Reverse (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTTCGG-3')⁸. 12,5µL bahan campuran kemudian diamplifikasi dengan proses predenaturasi dengan suhu 95°C selama 2 menit, lalu proses denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik *annealing* dengan suhu 55°C selama 30 detik dan proses ekstensi pada suhu 72 °C selama 15 detik dan ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 5 menit yang dilakukan dalam 20 siklus. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 2,5% dalam TBE buffer 0,5x pada

tegangan 100 volt, dengan waktu 35 menit. Hasil elektroforesis dilihat di bawah sinar UV λ 312 nm menggunakan alat UV transilluminator. Ukuran pita DNA hasil amplifikasi sekuen IS6110 yang diharapkan adalah 123 bp.⁹ Hasil gambar elektroforesis bersifat kualitatif kemudian dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak ImageJ (diunduh di:

<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Analisis data menggunakan aplikasi SPSS 17.0 dengan melakukan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji komparabilitas *One-Way ANOVA* dan Post Hoc Tamhane Test (kemaknaan $p < 0,05$) dan hasil dalam bentuk grafik menggunakan perangkat lunak GraphPad®.

HASIL



Gambar 1. Intensitas pita DNA *M. tuberculosis* hasil amplifikasi dengan PCR melalui ekstraksi DNA menggunakan metode pemanasan (*rapid boiling*)

Keterangan : 5', 10', 15' 30' = waktu pemanasan dalam menit;
123 bp = panjang amplicon sekuen IS6110

Hasil menunjukkan terdapat pita DNA yang teramati pada gel agarosa pada semua sampel dan juga

semua kelompok perlakuan dengan intensitas yang bervariasi.

Tabel 1. Analisis Deskriptif Intensitas Pita DNA

Kelompok	n	Rata-rata \pm SB	Minimum	Maksimum
Kontrol -	4	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
Kontrol +	4	13959,58 \pm 2612,91	10828,31	17225,75
5 menit	4	12724,35 \pm 4559,64	7299,32	18458,82
10 menit	4	14448,17 \pm 5743,03	8168,44	22090,02
15 menit	4	15398,90 \pm 6355,67	10061,97	22875,38
30 menit	4	21199,02 \pm 10385,21	9246,25	33681,18

Keseluruhan kelompok perlakuan dapat mengekstraksi DNA pada semua sampel *Mycobacterium tuberculosis* (Gambar 1). Berdasarkan hasil kuantifikasi, rerata intensitas pita DNA meningkat seiring waktu pemanasan dimana rerata intensitas pita DNA terkecil terdapat pada waktu pemanasan tercepat yaitu 5 menit dan rerata intensitas pita DNA terbesar terdapat pada waktu pemanasan terlama

yaitu 30 menit. Secara umum dapat diasumsikan bahwa terdapat hubungan yang berbanding lurus antara waktu pemanasan dengan konsentrasi DNA yang dapat terekstraksi. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa rerata intensitas pita DNA pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,003$).

Tabel 2. Hasil Uji Lanjutan Perbedaan Rerata Intensitas Pita DNA Antar Kelompok

Kelompok Perbandingan (a:b)	Beda Rerata (a-b)	p	Interpretasi
Kontrol - : Kontrol +	-13959,58	0,026	Signifikan
5 menit : Kontrol +	-1235,22	1,000	Tidak Signifikan
10 menit : Kontrol +	488,59	1,000	Tidak Signifikan
15 menit : Kontrol +	1439,33	1,000	Tidak Signifikan
30 menit : Kontrol +	7239,45	0,989	Tidak Signifikan

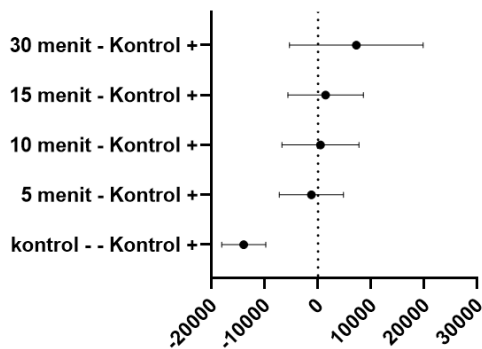
Keterangan: $p < 0,05$ = signifikan; $p > 0,05$ = tidak signifikan

Uji *Post Hoc Tamhane Test* menunjukkan bahwa kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan hanya terdapat pada perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada perbandingan kelompok perlakuan dengan kontrol positif tidak ditemukan adanya perbedaan yang signifikan. Perbandingan keseluruhan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif tidak memiliki perbedaan rerata intensitas pita DNA yang signifikan (Tabel 2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi dengan pemanasan pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan hasil yang serupa dengan metode ekstraksi DNA bakteri yang menggunakan kit komersial karena secara statistik tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna.

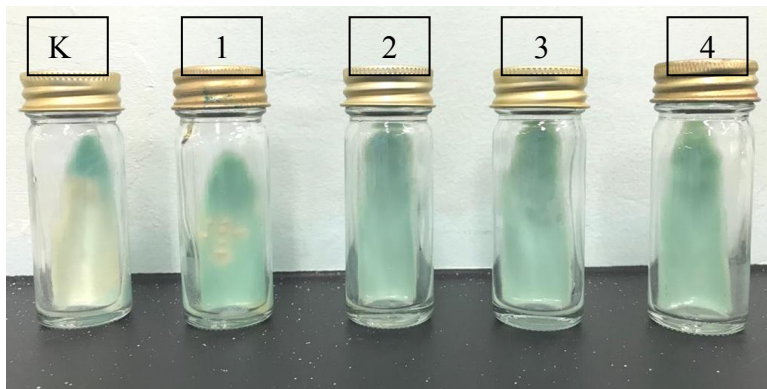
Pemanasan selama 5 menit dapat mengekstraksi DNA dengan ditemukan bahwa perbedaan rata – rata intensitas pita DNA mendekati kontrol positif tetapi rerata tersebut masih berada dibawah kontrol positif. Pemanasan dengan waktu 10 menit, 15 menit dan 30 menit menunjukkan dapat mengekstraksi DNA dengan perbedaan rerata intensitas pita DNA keseluruhan kelompok perlakuan tersebut diatas kontrol positif. Hal ini dapat diasumsikan bahwa pemanasan bakteri *M. tuberculosis* baik selama 10 menit, 15 menit dan 30 menit dapat mengekstraksi DNA dengan kuantitas yang sama baiknya dengan kontrol positif dengan hasil rerata yang meningkat seiring waktu pemanasan yang meningkat. Gambar 2 juga menunjukkan sebaran interval kepercayaan 95% yang berada diantara kontrol positif.

Keamanan metode ini juga dinilai dengan efek letal bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Untuk menilai kondisi bakteri sudah terinaktivasi sempurna, metode yang dapat digunakan adalah dengan mengkultur ulang supernatan hasil ekstraksi dengan metode pemanasan. Bakteri yang masih aktif dapat tumbuh kembali pada media kultur yang sesuai.

Pada penelitian ini, prosedur untuk menilai keamanan dan efektivitas metode pemanasan dalam menginaktivasi bakteri dilakukan dengan mengamati hasil kultur ulang supernatan dalam media Lowenstein-Jensen. Prosedur tersebut sama dengan prosedur saat kultur isolat klinis sebagai sampel sebelumnya. Hasil kultur ulang disajikan dalam Gambar 3.



Gambar 2. Perbedaan Rerata Intensitas Pita DNA dengan Kelompok Kontrol Positif dengan Sebaran Interval Kepercayaan 95%.



Gambar 3. Hasil Kultur Ulang Supernatan *M. tuberculosis* H37Rv Setelah Prosedur Pemanasan 100°C, K+= kontrol positif; tidak dilakukan pemanasan, Waktu Pemanasan 1= 2 menit, 2= 5 menit, 3= 10 menit, 4= 15 menit

Hasil kultur ulang terhadap supernatan selama 4 minggu setelah metode pemanasan seperti pada Gambar 3. ditemukan hasil kultur positif pada kontrol positif dan waktu pemanasan selama 2 menit. Tetapi pada pemanasan selama 5 menit, hasil kultur ulang menunjukkan bahwa tidak terbentuk koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sehingga dapat diasumsikan bahwa pemanasan selama 5 menit telah mampu menginaktivasi pertumbuhan bakteri dengan kata lain bakteri telah mati setelah pemanasan selama 5 menit. Hasil kultur ulang juga negatif pada sampel dengan pemanasan selama 10 menit dan 15 menit sehingga dapat diasumsikan pemanasan selama 30 menit juga akan mendapatkan hasil kultur negatif.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapat bahwa kelompok perlakuan secara keseluruhan waktu pemanasan mampu mengekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis*. Paparan temperatur tinggi diketahui dapat merusak struktur membran sel dan juga dinding sel suatu mikroorganisme dengan meningkatkan permeabilitasnya sehingga DNA dapat keluar dari dalam sel.¹⁰ Penelitian ini memanfaatkan metode pemanasan konvensional dengan bahan dasar pelarut air steril karena penelitian ini menguji waktu sebagai fokus utama variabel yang akan diteliti sehingga media pemanasan disamakan agar faktor perancu (media pemanasan lain) yang dapat berperan mempengaruhi hasil ekstraksi dapat disingkirkan.

Metode pemanasan menjadi tantangan bagi bakteri gram positif karena metode ini harus merusak dinding bakteri yang lebih tebal dan padat. Menurut penelitian Holmes¹², suhu tinggi (100°C) dapat digunakan untuk mikroba dan spesimen lain karena fungsi metode ini adalah melemahkan

<https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>
doi:10.24843.MU.2020.V9.i2.P16

ikatan struktur dinding sel. Penelitian Yamagishi¹³, salah satunya membandingkan metode pemanasan 99°C selama 15 menit dalam mendeteksi mikroba gram positif dan gram negatif pada organ dan rongga mulut subjek. 166 sampel bakteri berdasarkan *Operational Terminology Units* (OTUs) (71 bakteri gram positif dan 95 gram negatif), dibandingkan berdasarkan efikasi metode pemanasan, ditemukan bahwa terdapat 19 bias dalam metode pemanasan tersebut dimana 14 bias dalam mendeteksi bakteri gram positif dan 5 bias dalam mendeteksi gram negatif. Hal ini menunjukkan bakteri dengan dinding sel yang tebal seperti karakteristik bakteri gram negatif menjadi tantangan metode pemanasan. Tetapi, peneliti tidak mempertimbangkan karakteristik biologis lain pada bakteri gram positif yang mengalami bias seperti karakteristik bakteri pembentuk spora dan juga susunan gen bakteri tersebut yang mungkin berbeda.

Kemurnian DNA hasil ekstraksi dalam penelitian ini dapat menjadi alasan terdapat perbedaan hasil pada sampel A. Penurunan kuantitas hasil elektroforesis pada sampel A mulai terjadi pada pemanasan selama 15 menit dan menurun seiring waktu pada pemanasan selama 30 menit. Hal ini dapat terjadi karena konsentrasi bakteri lebih rendah, strain bakteri yang lebih tidak tahan panas sehingga DNA dapat terekstraksi lebih cepat dan atau kemurnian hasil ekstraksi yang rendah Pemanasan dengan waktu yang lama dikhawatirkan dapat merusak DNA target yang akan diamplifikasi.¹⁰ Struktur dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* serupa dengan struktur dinding sel bakteri gram positif pada umumnya tetapi lebih kompleks dan tebal.

Penelitian Muna¹⁰, membandingkan konsentrasi DNA hasil metode ekstraksi dengan pemanasan terhadap bakteri gram positif *Corynebacterium diphtherinae*, penelitian tersebut menemukan tidak ada perbedaan yang signifikan rerata konsentrasi DNA yang diekstraksi dengan metode pemanasan dalam suhu 100°C selama 10 menit (109,7 ng/μL) dibandingkan dengan DNA yang diekstraksi menggunakan QiAMP DNA Minikit dengan total waktu 2 jam (110,0 ng/μL). Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa metode pemanasan dapat diaplikasikan pada pemeriksaan bakteri karena memiliki kualitas dan kuantitas yang cukup untuk pemeriksaan PCR dan juga dinilai lebih efektif dan efisien.

Prosedur pemanasan dalam penelitian ini juga mengikuti prosedur *snap-chilled method*.¹¹ Prosedur terdiri dari prosedur *snap* yaitu segera memanaskan tabung berisi suspensi bakteri ketika media pemanasan sudah sesuai suhu yang diharapkan (100±1°C) dan prosedur *chilled* yaitu segera mendinginkan tabung dalam es. Prosedur ini bertujuan agar dinding sel bakteri yang rusak atau permeabilitas lipidnya meningkat sehingga DNA keluar dari dalam sel tidak dapat kembali memperbaiki struktur sel karena lipid pada dinding sel segera membeku setelah ikatannya rusak saat prosedur pemanasan sehingga DNA tetap berada diluar sel, struktur bakteri tetap rusak, bakteri terinaktivasi sempurna, waktu pemanasan tidak memanjang dan juga DNA yang menjadi target amplifikasi sudah terekstraksi dengan baik.¹¹

Pemanasan dengan waktu kurang dari 5 menit tidak disarankan karena hasil kultur ulang pada Gambar 3 menyatakan pemanasan dengan waktu lebih cepat dari 5 menit belum sepenuhnya membunuh bakteri karena setelah dilakukan kultur ulang, terdapat koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh. Analisis statistik yang menyatakan interval kepercayaan yang cukup bervariasi dan komparabilitas yang tidak signifikan dikarenakan jumlah sampel yang sedikit.

SIMPULAN

Metode pemanasan (*rapid boiling*) dengan suhu 100±1°C dapat digunakan untuk mengekstraksi genom DNA *M. tuberculosis* sebagai *template* PCR untuk amplifikasi sekuen IS6110 dengan waktu 10-30 menit.

SARAN

Pada penelitian ini pengulangan teknis yang dilakukan pada masing – masing sampel hanya dua kali meskipun menampilkan hasil yang serupa, tetapi untuk mengkonfirmasi dan juga meningkatkan validitas hasil penelitian diharapkan untuk penelitian selanjutnya

<https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>
doi:10.24843.MU.2020.V9.i2.P16

melakukan prosedur setidaknya tiga kali pengulangan teknis dan juga menggunakan jumlah sampel yang lebih besar agar dapat meningkatkan presisi tingkat keberhasilan metode dan waktu optimal ekstraksi DNA dengan metode pemanasan (*rapid boiling*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Banuls, A. L. dkk. 2015. *Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium*. Journal of Medical Microbiology. 2015;64(11):1261–1269. doi: 10.1099/jmm.0.000171.
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2018*. 2018. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Division of Tuberculosis Elimination CDC. *Drug-Resistant TB*. Center for Disease Control and Prevention. Artikel *Online*. 2017. Tersedia di: <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.htm> [diakses pada 1 Desember 2018].
4. World Health Organization. *MDR TB/RR TB Factsheet TB 2017*. 2017: 1–2. Tersedia di: http://www.who.int/tb/publications/2011/factsheet_tb_2011.pdf. [diakses 13 Desember 2019].
5. Farzam, B. dkk. *Comparison of cyp141 and IS6110 for detection of Mycobacterium tuberculosis from clinical specimens by PCR*. Journal of Infection and Public Health. King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. 2017;8(1):32–36. doi: 10.1016/j.jiph.2014.08.005.
6. Roychowdhury, T., Mandal, S. dan Bhattacharya, A. *Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group. 2015;5(Juli):1–10. doi: 10.1038/srep12567.
7. Ribeiro, J. C. dkk. *Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk*. *Semina: Ciências Agrarias*. 2016;37(5):3069–3078. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069.
8. Osman, A. L., Saeed, N. S. dan Elhassan, M. M. *Polymerase Chain Reaction targeting insertion sequence IS6110 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis among Sudanese children and young adults*. *International Journal of Mycobacteriology*. Asian-African Society for Mycobacteriology. 2014;3(4):252–258. doi:

- 10.1016/j.ijmyco.2014.09.014.
9. Kabir, S. dkk. *Role of PCR method using IS6110 primer in detecting Mycobacterium tuberculosis among the clinically diagnosed childhood tuberculosis patients at an urban hospital in Dhaka, Bangladesh.* International Journal of Infectious Diseases. 2018;68:108–114. doi: 10.1016/j.ijid.2018.01.015.
10. Muna, F. dkk. *Metode Cepat Ekstraksi Dna Corynebacterium Diphtheriae Untuk Pemeriksaan Pcr Quick Method To Extract Corynebacterium Diphterinae Dna For Pcr Examination.* Bul. Penelit. Kesehat. 2014;42(2):85–92.
11. Mohamed Nadeem Fairuze, C. O. V., S.M. Byre Gowda, C. B. M. dan Nagappa Karabasanavar, C. S. N. *Studies on Occurrence, Antibiogram and Decontamination of Salmonella enterica in Table Eggs.* International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(3):2163–2175. doi: 10.20546/ijcmas.2017.603.247.
12. Holmes, D. S. and Quigley, M. *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.* Analytical Biochemistry. 1981;114(1). hal. 193–197. doi: 10.1016/0003-2697(81)90473-5.
13. Yamagishi, J. dkk. *Comparison of boiling and robotics automation method in DNA extraction for metagenomic sequencing of human oral microbes.* PLoS ONE. 2016;11(4). hal. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0154389.

