

Comparison of Boiling Methods for Bacterial DNA Isolation Using Waterbath and Heatblock

Perbandingan Metode *Boiling* untuk Isolasi DNA Bakteri Menggunakan *Waterbath* dan *Heatblock*

Fadila Sirwati¹, Siti Nurfalinda¹, Siti Atika Salsabila¹, Dwi Hilda Putri^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: dwihildaputri.08@gmail.com

Abstract

Molecular biology analysis has several advantages over culture approaches, including the ability to identify a wider range of target organisms, increased sensitivity and specificity. Bacterial DNA isolation is a simple solution in molecular biology analysis. Boiling techniques using high temperature heating can damage cell wall permeability. Heating boiling technique can be done by using waterbath, and heat block with different heat transfer mechanism. The results showed the concentration value of samples isolated using heatblock was in the range of 77,6 ng/ μ l – 200,45 ng/ μ l, while the concentration of samples isolated using waterbath was in the range of 145,575 ng/ μ l – 288,8 ng/ μ l. The highest DNA concentration was obtained from using a waterbath. Purity values measured at wavelengths A260/A280 were obtained with a range of purity that was not different.

Key words: *DNA Isolation, Boiling, Waterbath, Heatblock*

Abstrak

Analisis biologi molekuler memiliki beberapa keunggulan dibandingkan pendekatan kultur, termasuk kemampuan untuk mengidentifikasi organisme target yang lebih luas, peningkatan sensitivitas, dan spesifisitas. Isolasi DNA bakteri merupakan solusi sederhana dalam analisis biologi molekuler. Teknik *boiling* menggunakan pemanasan suhu tinggi dapat merusak permeabilitas dinding sel. Pemanasan teknik *boiling* dilakukan dengan menggunakan *waterbath*, dan *heatblock* dengan mekanisme transfer panas yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan nilai konsentrasi sampel yang diisolasi menggunakan *heatblock* berada pada kisaran 77,6 ng/ μ l – 200,45 ng/ μ l, sedangkan konsentrasi sampel yang diisolasi menggunakan *waterbath* berada pada kisaran 145,575 ng/ μ l – 288,8 ng/ μ l. Konsentrasi DNA tertinggi didapatkan dari menggunakan *waterbath*. Nilai kemurnian yang diukur pada panjang gelombang A260/A280 diperoleh dengan rentang kemurnian yang tidak berbeda.

Kata kunci: *Isolasi DNA, Boiling, Waterbath, Heatblock*

Pendahuluan

Mikrobiologi dan biologi molekuler adalah dua pendekatan yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri tertentu dari sampel lingkungan (Silva & Domingues, 2015). Metode berbasis kultur tradisional memiliki keterbatasan baik secara kuantitatif dan kualitatif. Metode berbasis kultur untuk deteksi bakteri dapat tidak akurat karena sifat media yang selektif sehingga membutuhkan penggunaan media dan kondisi kultur yang sesuai untuk setiap mikroorganisme yang diinginkan (Price & Wildeboer, 2017). Pendekatan biologi molekuler dapat memberikan deteksi yang lebih tepat (Zhang *et al.*, 2021). Analisis biologi molekuler memiliki beberapa keunggulan dibandingkan pendekatan kultur, termasuk kemampuan untuk mengidentifikasi organisme target

yang lebih luas, peningkatan sensitivitas, dan spesifisitas. Pendekatan molekuler umumnya diterapkan pada isolat tunggal dan pengayaan. Pengayaan meningkatkan jumlah bakteri, meskipun hanya mengungkapkan bakteri hidup, tidak dapat memperkirakan jumlah, dan hanya memberikan indikasi ada dan tidaknya, oleh karena DNA bakteri yang hidup tidak dapat dipisahkan dengan menggunakan pendekatan berbasis kultur tradisional, solusi paling sederhana adalah mengisolasi DNA dari sel bakteri (Omar & Barnard, 2014).

Metode isolasi DNA menjadi tahapan penting untuk menghasilkan DNA murni. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya (Putri *et al.*, 2023). Isolasi DNA dilakukan dengan merusak atau memecahkan dinding sel, sehingga memungkinkan DNA keluar dari dalam sel. Dalam isolasi DNA bakteri, ada banyak metode yang telah dikembangkan, termasuk teknik boiling, metode fenol-kloroform, dan kit (Dashti *et al.*, 2009; Handayani & Putri, 2021). Kunci kualitas dan kuantitas yang baik bergantung pada metode isolasi DNA (Mardhotillah *et al.*, 2023). Teknik boiling menggunakan pemanasan suhu tinggi mampu merusak permeabilitas dinding sel, membran menjadi tidak lengkap karena pemanasan (Ruchi *et al.*, 2019). Pemanasan teknik boiling dapat dilakukan dengan menggunakan *waterbath* dan *heatblock*. Pemanasan dalam *waterbath* dan *heatblock* melibatkan transfer panas melalui konveksi dan konduksi. Pada *waterbath*, energi panas dari sumber eksternal, seperti pemanas listrik, ditransfer ke air melalui konveksi, di mana air panas naik dan air dingin turun, menciptakan aliran. Di sisi lain, pemanasan di atas *heatblock* melibatkan transfer panas melalui konduksi, di mana panas langsung ditransfer dari balok ke benda yang berada di atasnya (Ikhsan *et al.*, 2017; Ramadhan & Irawansyah, 2018). Perbedaan mekanisme transfer panas antara pemanasan dalam *waterbath* dan di atas *heatblock* inilah mendorong dilakukannya penelitian mengenai perbandingan efektivitas isolasi DNA bakteri menggunakan metode *boiling waterbath* dan *heatblock*.

Bahan dan Metode

Preparasi Isolat Bakteri

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan kultur stok di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Universitas Negeri Padang. Bakteri dengan kode CB, PSB2 dan PSB5 merupakan isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman (Advinda *et al.*, 2022). Kultur stok ini diremajakan dengan diinokulasi dalam biakan miring media Kings B. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam.

Isolasi DNA

Isolasi DNA diawali dengan menginokulasikan 3-4 ose hasil peremajaan tiap isolat ke dalam 700 μ L buffer TE (10^{-1}), selanjutnya proses isolasi masing-masing dilakukan dalam *waterbath* dan di atas *heatblock* pada suhu 97°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan DNA dan komponen yang bukan DNA. Setelah itu, supernatant yang terkumpul dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA.

Pengukuran Konsentrasi Kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA bakteri dilakukan dengan menggunakan Nanophotometer diukur pada panjang gelombang (λ) 260. Sebanyak 2 μ L Buffer TE diteteskan pada Nanophotometer sebagai blanko, selanjutnya dibersihkan menggunakan tisu. Sebanyak 2 μ L sampel DNA diukur konsentrasi dan kemurnian. DNA berkualitas baik apabila pada kemurnian A260/A280 dalam rentang 1,8-2,1 (Handayani & Putri, 2021).

Analisis Data

Data hasil Nanophotometer kemudian dianalisis dengan cara melakukan uji rata-rata terhadap nilai kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi (Sophian & Syukur, 2021).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA bakteri menggunakan metode *boiling* menggunakan *waterbath* dan *heatblock*, dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 1. Hasil uji konsentrasi dan kemurnian DNA

Metode	Sampel	Konsentrasi (ng/μL)	Rasio
			Absorban A260/A280
<i>Heatblock</i>	CB	77,6	1,998
	PSB2	104,475	1,9355
	PSB5	200,45	1,9655
<i>Waterbath</i>	CB	145,575	2,0235
	PSB2	151,15	1,968
	PSB5	288,8	2,039

Kuantitas DNA yang telah diisolasi dapat diuji secara kuantitatif dengan Nanophotometer. Prinsip pengukuran jumlah DNA menggunakan Nanophotometer didasarkan bahwa iradiasi sinar ultra violet (UV) diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Iqbal *et al.*, 2016).

Hasil isolasi DNA bakteri metode *boiling* menggunakan *waterbath* dan *heatblock*, pada Tabel 1. menunjukkan nilai konsentrasi sampel yang diisolasi menggunakan *heatblock* berada pada kisaran 77,6 ng/μl – 200,45 ng/μl, sedangkan konsentrasi sampel yang diisolasi menggunakan *waterbath* berada pada kisaran 145,575 ng/μl – 288,8 ng/μl. Konsentrasi DNA tertinggi didapatkan dari menggunakan *waterbath*. Nilai kemurnian yang diukur pada panjang gelombang A260/A280 diperoleh dengan rentang kemurnian yang tidak berbeda jauh. Kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorban A260/280 pada sampel DNA. Nilai 260nm merupakan nilai maksimal DNA dapat menyerap cahaya, nilai tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi DNA, sedangkan nilai 280 nm merupakan nilai maksimal residu protein dapat menyerap cahaya (Sambrook, 1989). Konsentrasi DNA dikatakan baik jika DNA yang diisolasi memiliki konsentrasi di atas 20, dengan nilai kemurnian dari ekstrak DNA berkisar antara 1,8-2,1 (Sophian & Syukur, 2021). Jika nilai kemurnian di bawah 1,8, DNA yang diisolasi mungkin terkontaminasi protein, dan sebaliknya, jika nilai kemurnian di atas 2,1 maka dapat diduga bahwa isolasi DNA yang dilakukan terkontaminasi RNA. (Eppendorf, 2016). Pada penelitian ini, hasil isolasi memiliki kemurnian yang berada dalam kisaran 1,8-2,1 sehingga dapat dikatakan DNA hasil isolasi memiliki kemurnian yang baik.

Analisis kemurnian dan konsentrasi dibaca menggunakan Nanophotometer dengan mengukur nilai absorban pada panjang gelombang A260/A280. Penggunaan panjang gelombang A260/A280 merupakan metode umum dalam mendeteksi nilai konsentrasi dan kemurnian DNA (Sophian, 2021). Leninger (1975), mengungkapkan bahwa dari 5 komposisi nukleotida penyusun DNA atau RNA jika dibaca absorbansinya pada panjang gelombang A260/A280 akan menunjukkan nilai yang bervariasi, yaitu: guanin (1.15), adenin (4.50), sitosin (1.51), urasil (4.00) dan timin (1.47). Hasil analisis kemurnian yang dihasilkan dari pembacaan absorbansi merupakan rata-rata dari nilai absorbansi empat atau lima asam nukleat ini. Inilah yang menjadi dasar penetapan nilai kemurnian umumnya untuk analisis DNA berada pada kisaran (1,8-2,1), sedangkan untuk RNA nilai kisaran akan lebih besar dari nilai tersebut karena pada RNA salah komponen penyusunnya adalah urasil yang jika dibandingkan dengan DNA yang disusun oleh timin maka urasil memiliki nilai yang lebih tinggi yaitu (4.00), sehingga jika dirata-rata maka nilai kemurniannya akan lebih tinggi jika dibandingkan dengan DNA.

Daftar Pustaka

Advinda, L., Putri, D. H., Anhar, A., & Irdawati, I. (2022). Identification and Characterization of Fluorescent *Pseudomonas* Producing Active Compounds Controlling Plant Pathogens. *Yuzuncu Yil University*

Journal of Agricultural Sciences. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.1144323>

- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, *41*(2), 117–122.
- Handayani, S. O., & Putri, D. H. (2021). Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum* L.). *Serambi Biologi*, *6*(2), 37–41.
- Ikhsan, R., Soeparman, S., Sasongko, M. N., & Brawijaya, U. (2017). Studi Kinerja Solar Water Heater Double Plate Dengan Aliran Zig-zag Beralur Balok. *Jurnal Rekayasa Mesin*, *8*(1), 37–46.
- Iqbal, M., Buwono, I. D., & Kurniawati, N. (2016). Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, *VI*(1), 54–65.
- Mardhotillah, I., Achyar, A., Chatri, M., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2023). *Optimization of DNA Isolation on Meat-Based Food Samples Using Phenol-Chloroform Method for the Development of Halal Detection Using In-House Method Analysis*. Atlantis Press International BV. https://doi.org/10.2991/978-94-6463-166-1_8
- Omar, K. B., & Barnard, T. G. (2014). Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in clinical and environmental water sources in South Africa using single-step 11-gene m-PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(10), 2663–2671. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1690-4>
- Price, R. G., & Wildeboer, D. (2017). *E. coli* as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters. In *Escherichia coli – Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications* (p. 127). <https://doi.org/10.5772/67330>
- Putri, A. A., Ahda, Y., Putri, D. H., Achyar, A., & Metode, B. (2023). *Optimization of Pathogenic Bacterial DNA Isolation in PCR- Based River Water Samples Optimasi Isolasi DNA Bakteri Patogen pada Sampel Air Sungai Berbasis PCR*. *8*(3), 471–475.
- Ramadhan, M. N., & Irawansyah, H. (2018). Pengaruh Penggunaan Turbulence Enhancer Terhadap Efisiensi Pada Kolektor Pemanas Air Tenaga Surya. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, *3*(April), 437–443.
- Ruchi, W., Putri, D. H., & Anhar, A. (2019). Comparison of Three Different DNA Isolation Methods To Degradate The *Trichoderma* Fungi Cell Wall. *Bioscience*, *3*(1), 50. <https://doi.org/10.24036/0201931102859-0-00>
- Silva, M. D., & Domingues, L. (2015). On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *113*, 400–411. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.015>
- Sophian, A. (2021). Short Communication : Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products Short Communication : Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry*, *19*(June), 21–24. <https://doi.org/10.13057/biofar/f190104>
- Sophian, A., & Syukur, A. (2021). Short Communication : Analysis of Purity and Concentration of Isolated DNA in Making Raw DNA of Rat Species. *Eruditio*, *1*(2), 1–5.
- Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'brien, J., Hai, F., & Jiang, G. (2021). Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis. *Water (Switzerland)*, *13*(24), 1–31. <https://doi.org/10.3390/w13243551>