



DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Setelah Halaman Judul	ii
Halaman Pengesahan oleh Dekan Fakultas Biologi.....	iii
Halaman Pengesahan Tim Promotor.....	iv
Halaman Pengesahan Disertasi	v
Halaman Pernyataan Keaslian Penelitian.....	vi
Prakata.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiv
Intisari	xv
<i>Abstract</i>	xvi
1. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
E. Keaslian Penelitian	6
F. Ruang Lingkup Penelitian	10
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	11
A. Ekstraksi DNA.....	11
B. Bakteri Sebagai Objek Ekstraksi DNA.....	13
C. Nanopartikel Magnetik	13
D. Karakterisasi Magnet.....	17
1. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	18
2. <i>X-ray Diffraction</i>	18
3. Mikroskop elektron.....	19
4. <i>Vibrating Sample Magnetometer</i>	20
5. Karakteristik nanopartikel magnetik untuk ekstraksi DNA	20
E. Kualitas Hasil Ekstraksi DNA	22
F. Desain penelitian faktorial.....	26
G. Landasan Teori	27
H. Hipotesis	32
3. METODE PENELITIAN.....	34
A. Bahan	34
B. Alat.....	35
C. Rancangan Penelitian.....	36
D. Prosedur Kerja	39
1. Optimasi prosedur ekstraksi DNA	39
a). Preparasi bakteri lingkungan	39



b). Preparasi nanopartikel magnetik	39
c). Optimasi prosedur ekstraksi DNA.....	40
d). Prosedur ekstraksi DNA.....	41
e). Pengujian kualitas ekstrak DNA	42
2. Optimasi faktor preparasi nanopartikel magnetik.....	42
a). Optimasi preparasi nanopartikel magnetik.....	42
b). Preparasi nanopartikel magnetik	43
c). Prosedur ekstraksi DNA optimal.....	44
d). Pengujian kualitas ekstrak DNA	45
3. Optimasi lanjutan terhadap faktor-faktor yang berpengaruh	45
a). Optimasi jumlah nanopartikel magnetik dan rasio TEOS.....	45
b). Preparasi nanopartikel magnetik optimal.....	46
c). Prosedur ekstraksi DNA optimal.....	47
d). Pengujian kualitas ekstrak DNA	47
4. Optimasi penggunaan <i>pyrogenic silica</i>	47
a). Optimasi jumlah nanopartikel magnetik dan rasio <i>pyrogenic silica</i>	47
b). Preparasi nanopartikel magnetik optimal.....	48
c). Prosedur ekstraksi DNA optimal.....	48
d). Pengujian kualitas ekstrak DNA	49
5. Karakterisasi nanopartikel magnetik.....	49
a). <i>Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X-ray</i>	49
b). <i>Transmitted Electron Microscope</i>	50
c). <i>X-ray Diffraction</i>	50
d). <i>Vibrating Sample Magnetometer</i>	51
e). Uji interaksi DNA dengan nanopartikel magnetik dengan <i>Fourier Transform Infra Red</i>	51
f). Uji <i>adsorption isotherm</i>	52
g). Uji regenerasi	53
6. Pengujian kinerja metode ekstraksi DNA	54
a). Preparasi bakteri uji.....	54
b). Preparasi biakan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
c). Preparasi spesimen klinis	57
d). Uji ekstraksi DNA dengan berbagai jenis bakteri.....	57
e). Uji ekstraksi DNA dengan berbagai jenis matriks	57
f). Uji komparasi metode ekstraksi DNA	58
g). Pengukuran konsentrasi DNA.....	39
h). Pengukuran kemurnian DNA	60
i). Prosedur elektroforesis.....	60
j). Prosedur <i>Polymerase Chain Reaction</i>	60
k). Prosedur sekuensing.....	63
E. Analisis Data	65
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	66



A. Optimasi Prosedur Ekstraksi DNA	66
B. Optimasi Faktor Preparasi Nanopartikel Magnetik	73
C. Optimasi Lanjutan Berdasarkan Jumlah Nanopartikel Magnetik Dan Rasio TE- OS.....	81
D. Uji Banding Garam Fe.....	84
E. Karakterisasi Nanopartikel Magnetik Terpilih.....	85
F. Optimasi Jumlah Nanopartikel Magnetik Dan Rasio <i>Pyrogenic Silica</i>	91
G. Karakterisasi Nanopartikel Magnetik Dilapisi <i>Pyrogenic Silica</i>	93
H. Uji Ekstraksi DNA Dengan Berbagai Jenis Bakteri	105
I. Uji Ekstraksi DNA Dengan Berbagai Jenis Matriks	107
J. Uji Komparasi Metode Ekstraksi DNA	113
5. PEMBAHASAN UMUM	136
6. SIMPULAN DAN SARAN	145
A. Simpulan	145
B. Saran	146
RINGKASAN	147
SUMMARY	151
7. DAFTAR PUSTAKA	155

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Daftar penelitian penelitian pengembangan ekstraksi DNA bakteri berbasis nanopartikel magnetik.....	7
Tabel 2. Analisis kesenjangan penelitian pengembangan ekstraksi DNA bakteri berbasis nanopartikel magnetik pada objek bakteri	9
Tabel 3. Karakteristik magnetit dan pemanfaatan DNA bakteri hasil ekstraksi.....	21
Tabel 4. Faktor optimasi prosedur ekstraksi DNA	41
Tabel 5. Faktor optimasi preparasi nanopartikel magnetik.....	43
Tabel 6. Perbandingan cara kerja metode hasil optimasi dan kit komersial.....	59
Tabel 7. Prosedur dan campuran PCR yang digunakan dalam penelitian ini	61
Tabel 8. Informasi primer yang digunakan pada penelitian ini	63
Tabel 9. Rangkuman parameter untuk analisis data	65
Tabel 10. Matrix desain Plackett-Burman dan data observasi untuk konsentrasi dan nilai A260/280	66
Tabel 11. Konsentrasi DNA (ng/μl) dan A260/280 pada semua percobaan yang dilakukan berdasarkan desain faktorial tiga faktor dan dua level.....	73
Tabel 12. Konsentrasi DNA (ng/μl) dan A260/280 pada semua percobaan yang dilakukan berdasarkan desain penelitian 3 x 3, rasio TEOS dan jumlah magnetit	82
Tabel 13. Konsentrasi DNA (ng/μl) dan A260/280 pada semua percobaan yang dilakukan berdasarkan desain penelitian 4 x 3, rasio <i>pyrogenic silica</i> dan jumlah magnetit	92
Tabel 14. Perbandingan hasil ekstraksi metode optimasi dan kit komersial.....	114
Tabel 15. Faktor yang dimodifikasi untuk meningkatkan konsentrasi	125
Tabel 16. Prosedur ekstraksi DNA menggunakan AMNP hasil penelitian ini	125
Tabel 17. Matriks uji dan nilai Ct dari setiap pengujian	128
Tabel 18. Prosedur ekstraksi DNA dengan AMNP yang sudah dimodifikasi (juga untuk kepentingan sekuensing bacaan panjang).....	130

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daftar agen pelais nanopartikel magnetik yang digunakan untuk ekstraksi DNA	8
Gambar 2. Diagram analisis pareto untuk prosedur dan reagen ekstraksi DNA.....	30
Gambar 3. Diagram analisis pareto untuk parameter preparasi nanopartikel magnetik	31
Gambar 4. Bagan alir penelitian disertasi.....	38
Gambar 5. <i>Pareto Chart of the Effects</i> untuk kedua respon kualitas DNA.....	67
Gambar 6. Plot interaksi antara jenis dan jumlah MNP terhadap respon konsentrasi DNA	69
Gambar 7. Grafik validasi untuk respon kualitas DNA (optimasi prosedur ekstraksi DNA).....	70
Gambar 8. Visualisasi elektroforesis hasil ekstraksi DNA dengan model 9.....	71
Gambar 9. Hasil amplifikasi gen CFP10 pada spesimen darah/ <i>blood</i> , serum/ <i>serum</i> sputum/ <i>sputum</i> , urin/ <i>urine</i> , dan kultur/ <i>culture</i> menggunakan qPCR berbasis probe	72
Gambar 10. <i>Pareto charts of the effects</i> untuk respon kualitas DNA	74
Gambar 11. Grafik validasi untuk respon kualitas DNA (optimasi faktor preparasi nanopartikel magnetik).....	76
Gambar 12. <i>Main effects plot</i> dan <i>interaction plot</i> untuk kualitas DNA....	77
Gambar 13. Visualisasi produk PCR dengan elektroforesis. Ukuran ampikon sekitar 1000 bp	81
Gambar 14. Plot contour untuk hasil pengujian ekstraksi DNA dengan faktor preparasi jumlah MNP dan rasio TEOS	82
Gambar 15. Visualisasi elektroforesis MNP terpilih	83
Gambar 16. Grafik perbandingan hasil ekstraksi antara garam Fe kualitas sintesis dan komoditas industri.....	85
Gambar 17. Pengamatan SEM untuk MNP terpilih	86
Gambar 18. Analisis EDX untuk MNP yang terpilih	87
Gambar 19. Pola XRD pada MNP terpilih	88
Gambar 20. Grafik VSM dari MNP terpilih	89
Gambar 21. Spektra IR larutan DNA, MNP, dan DNA+MNP dalam <i>binding buffer</i>	90
Gambar 22. Plot contour untuk hasil pengujian ekstraksi DNA dengan faktor preparasi jumlah MNP dan jumlah <i>pyrogenic silica</i>	93
Gambar 23. Hasil SEM untuk AMNP	94
Gambar 24. Analisis EDX pada AMNP	95
Gambar 25. Analisis EDX- <i>mapping</i> pada AMNP.....	95
Gambar 26. Hasil TEM untuk AMNP	96



Gambar 27. Pola XRD pada AMNP	98
Gambar 28. Grafik VSM dari AMNP.....	98
Gambar 29. Spektra IR DNA, AMNP, dan DNA + AMNP dalam <i>binding buffer</i>	100
Gambar 30. (A) Regresi linear untuk Model Freundlich. (B) Regresi linear untuk Model Langmuir. (C) Plot <i>adsorption isotherm</i> . (D) % <i>recovery</i> DNA setiap lima menit.....	103
Gambar 31. Perbandingan hasil ekstraksi AMNP sebanyak lima kali pengulangan	104
Gambar 32. Visualisasi DNA hasil ekstraksi pada 0,8% agarosa (berbagai jenis bakteri).....	106
Gambar 33. Visualisasi produk PCR dengan elektroforesis (berbagai jenis bakteri).....	107
Gambar 34. Visualisasi produk PCR dengan elektroforesis (jenis matriks)	108
Gambar 35. Grafik sinyal fluorosensi yang telah dinormalisasi dengan siklus amplifikasi, grafik untuk perhitungan efisiensi PCR, dan tabel nilai ΔC_t dari aktual dengan persamaan garis untuk enam spesimen yang diuji.....	110
Gambar 36. Grafik sinyal fluorosensi yang telah dinormalisasi dengan siklus amplifikasi, grafik untuk perhitungan efisiensi PCR, dan tabel nilai ΔC_t dari aktual dengan persamaan garis (<i>probe-based</i> pada uji komparasi).....	119
Gambar 37. Grafik sinyal fluorosensi yang telah dinormalisasi dengan siklus amplifikasi, grafik untuk perhitungan efisiensi PCR, dan tabel nilai ΔC_t dari aktual dengan persamaan garis, dan analisis T_m (<i>intercalating dye</i> pada uji komparasi).....	120
Gambar 38. Kromatogram dan sekuens amplicon metode optimasi dan kit komersial.....	121
Gambar 39. Hasil analisis BLAST	122
Gambar 40. Sepuluh <i>entry</i> pertama dari BLAST pada <i>database</i> koleksi nuklotida NCBI	123
Gambar 41. Hasil analisis pada respon C_t	129
Gambar 42. Kualitas bacaan dan panjang bacaan DNA hasil ekstraksi menggunakan Nanopore.....	131
Gambar 43. Hasil analisis FastQC.....	134
Gambar 44. Pita RNA.....	142



DAFTAR SINGKATAN

AMNP	: <i>A pyrogenic silica-coated magnetic nanoparticle</i>
bp	: <i>base pair</i>
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRIN	: <i>Badan Riset dan Inovasi Nasional</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumine</i>
Ct	: <i>Cycle Threshold</i>
Covid-19	: <i>Corona Virus Disease 2019</i>
CV	: <i>Coefficient Variance</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DIN	: <i>DNA Integration Number</i>
EDX	: <i>Energy Dispersive X-ray</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
fg	: <i>femto gram</i>
FT-IR	: <i>Fourier Transform Infra-Red</i>
GuHCl	: <i>Guanidine Hydrochloride</i>
GuSCN	: <i>Guanidine Isothiocyanate</i>
IGF	: <i>Integrated Genome Factory</i>
kb	: <i>Kilo-base</i>
KODC	: <i>Konimex Diagnostic Center</i>
MNP	: <i>Magnetic nanoparticle</i>
NaCl	: <i>Sodium Chloride</i>
NCBI	: <i>National Center of Biotechnology Information</i>
LJ	: <i>Lowenstein-Jensen</i>
Mb	: <i>Mega-base</i>
MNP	: <i>Magnetic Nanoparticle</i>
OFAT	: <i>One Factor at A Time</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	: <i>Rotation per minute</i>
SEM	: <i>Scanning Electron Microscopy</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>
TEM	: <i>Transmitted Electron Microscopy</i>
Tm	: <i>Temperature melting</i>
TSB	: <i>Tryptone Soy Broth</i>
TEOS	: <i>Tetraethyl orthosilicate</i>
VSM	: <i>Vibrating Sample Magnetometer</i>
XRD	: <i>X-ray Diffraction</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>