

**OPTIMASI EKSTRAKSI DNA (*DEOXYRIBO NUCLEIC ACID*)
PSEUDONOCARDIA CARBOXYDIVORANS 18A213O1 YANG BERASAL
DARI TUNIKATA DENGAN KIT EKSTRAKSI
PROMEGA DAN QIAGEN**

Skripsi

Oleh

Syifa Riandani Azzahra

1917021068



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

**OPTIMASI EKSTRAKSI DNA (*DEOXYRIBO NUCLEIC ACID*)
PSEUDONOCARDIA CARBOXYDIVORANS 18A213O1 YANG BERASAL
DARI TUNIKATA DENGAN KIT EKSTRAKSI PROMEGA DAN QIAGEN**

Oleh

SYIFA RIANDANI AZZAHRA

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

OPTIMASI EKSTRAKSI DNA (*DEOXYRIBO NUCLEIC ACID*) *PSEUDONOCARDIA CARBOXYDIVORANS* 18A21301 YANG BERASAL DARI TUNIKATA DENGAN KIT EKSTRAKSI PROMEGA DAN QIAGEN

Oleh

SYIFA RIANDANI AZZAHRA

Tunikata merupakan salah satu organisme laut yang dapat berasosiasi dengan *Actinobacteria*. Terjadi hubungan simbiosis mutualisme antara tunikata dengan *Actinobacteria*. Tunikata akan menjadi sumber nutrisi bagi *Actinobacteria* sedangkan *Actinobacteria* akan menghasilkan senyawa bioaktif yang berguna untuk melawan serangan makhluk hidup lain. Contoh senyawa bioaktif seperti antibiotik, pestisida dan agen antitumor. Tahap awal untuk mengidentifikasi suatu senyawa bioaktif adalah dengan cara mengisolasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai optimasi penggunaan perbedaan antara kit ekstraksi promega dan qiagen. Penelitian ini terdiri atas 3 perlakuan yaitu peremajaan, identifikasi bakteri dan pengukuran konsentrasi serta kemurnian menggunakan kit ekstraksi promega dan qiagen. Setiap perlakuan dilakukan dengan 2 kali ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan konsentrasi dan kemurnian pada kit ekstraksi qiagen relatif lebih besar berkisar 1,989 dan 2,000 dibandingkan kit ekstraksi promega sebesar 1,943 dan 1,500. Waktu pengerjaan kit qiagen lebih singkat berkisar 35 menit dibandingkan pengerjaan kit ekstraksi promega yang mencapai 2 jam 30 menit.

Kata Kunci : Kit ekstraksi promega dan qiagen,
Pseudonocardia carboxydivorans, Tunikata

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF DNA (DEOXYRIBO NUCLEIC ACID) EXTRACTION PSEUDONOCARDIA CARBOXYDIVORANS 18A21301 DERIVED FROM TUNICATES WITH PROMEGA AND QIAGEN EXTRACTION KITS

By

SYIFA RIANDANI AZZAHRA

Tunicates are one of the marine organisms that can associate with *Actinobacteria*. There is a symbiotic relationship of mutualism between tunicates and *Actinobacteria*. Tunicates will be a source of nutrients for *Actinobacteria* while *Actinobacteria* will produce bioactive compounds that are useful to fight the attack of other living things. Examples of bioactive compounds include antibiotics, pesticides and antitumor agents. The initial stage to identify a bioactive compound is by isolating DNA. This study aims to provide information on optimizing the use of differences between promega and qiagen extraction kits. This study consisted of 3 treatments, namely rejuvenation, bacterial identification and measurement of concentration and purity using promega and qiagen extraction kits. Each treatment was carried out with 2 replicates. The results of this study showed that the concentration and purity of the qiagen extraction kit were relatively greater around 1.989 and 2.000 compared to the promega extraction kit of 1.943 and 1.500. The qiagen kit processing time is shorter around 35 minutes compared to the promega extraction kit which reaches 2 hours 30 minutes.

Keywords: Promega and qiagen extraction kits,
Pseudonocardia carboxydivorans, Tunicates

LEMBAR PENGESAHAN

Judul skripsi : OPTIMASI EKSTRAKSI DNA (*DEOXYRIBONUCLEIC ACID*) *PSEUDONOCARDIA CARBOXYDIVORANS* 18A21301 YANG BERASAL DARI TUNIKATA DENGAN KIT EKSTRAKSI PROMEGA DAN QIAGEN

Nama Mahasiswa : Syifa Riandani Azzahra

Nomor Pokok Mahasiswa : 1917021068

Jurusan/Program Studi : Biologi/S1-Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Dr. Kusuma Handayani, M.Si.

NIP 197808192008012018

Pembimbing II

Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.

NIP 197912302008121001

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Unila

Dr. Jani Mastor, S.Si., M.Si.

NIP 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. kusuma Handayani, M.Si.**

Sekretaris : **Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.**

Penguji : **Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 6 Maret 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Syifa Riandani Azzahra
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917021068
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Optimasi Ekstraksi DNA *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A213O1 Yang Berasal Dari Tunikata Dengan Kit Ekstraksi Promega dan Qiagen”** adalah benar karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku. Kemudian saya juga tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan.

Demikian pernyataan ini saya buat. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggung jawabkannya.

Bandar Lampung, April 2024

menyatakan,



Syifa Riandani Azzahra
NPM. 1917021068

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Panjang, Lampung Selatan, Provinsi Lampung pada tanggal 03 Juli 2001, anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Rusli Rianda dan Ibu Hapsari Palupi.

Penulis menempuh pendidikan pertama di Taman Kanak-kanak (TK) Aisyiyah Bustanul Athfal pada tahun 2004 - 2006. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan ke Sekolah Dasar Negeri (SDN) 2 Poncowati pada tahun 2006 - 2013. Pada tahun 2013 – 2016 pendidikan dilanjutkan di Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 1 Poncowati dan tingkat Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) di SMAN 1 Lampung Tengah pada tahun 2016-2019. Pada Tahun 2019, penulis resmi tercatat menjadi salah satu mahasiswa baru Prodi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menempuh pendidikan sebagai salah satu mahasiswa jurusan biologi, penulis aktif menjadi pengurus organisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) sebagai anggota bidang Kesekretariatan dan Logistik (Kalog) pada tahun 2019-2021. Pada tahun 2020 – 2021 penulis aktif sebagai anggota divisi Hubungan Diplomas Eksternal (HDE) dan anggota divisi Hubungan Luar (Hublu) pada Organisasi Badan Eksklusif Mahasiswa (BEMF) tingkat fakultas. Pada tahun 2022-2023 penulis menjadi asisten praktikum mata kuliah Fisiologi Mikroba, Mikrobiologi Pangan dan Industri serta Bioteknologi. Penulis

Melaksanakan Karya Tulis Ilmiah (KWI) di Desa Tambah Dadi, Kecamatan Purbolinggo, Lampung Timur pada tahun 2019. Tahun 2022, Penulis melaksanakan Kerja Praktik Lapangan (PKL) di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Abdul Moeloek dengan judul laporan **“Identifikasi Bakteri Patogen dan Pola Sensitivitas Terhadap Antibiotik Dari Spesimen Cairan Tubuh, Feses dan Urine Menggunakan Vitek 2 Compact Di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung”**. Kemudian, pada bulan Juli – Agustus 2022 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Itik Rendai, Kecamatan Melinting, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung. Penulis melaksanakan penelitian pada bulan Mei – Agustus 2023 di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTIST) Universitas Lampung.

MOTTO

“Dan bersabarlah kamu, sesungguhnya janji Allah adalah benar”

(QS Ar-Rum : 60)

“Jangan takut pada bayangan, karena di dekatnya pasti ada cahaya”

(City Hunter)

“Yang hancur hanyalah rencanamu bukan dirimu atau masa depanmu, yang kita pikir baik belum tentu tuhan setuju, tapi yang tuhan kasih sudah pasti terbaik”

(Anonim)

PERSEMBAHAN

Atas izin Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya serta rasa syukur yang luar biasa.

Ku persembahkan karya sederhana ini sebagai wujud cinta, bakti, sayangku dan terima kasihku kepada :

Untuk kedua orang tuaku Bapak Rusli Rianda dan Ibu Hapsari Palupi

Terimakasih telah memberikan dukungan baik moril, materi dan doa yang tak henti – hentinya untuk kesuksesanku. Ucapan terimakasih saja takkan pernah cukup untuk membalas kebaikan orang tuaku. Sekali lagi terimakasih atas cinta, kehangatan serta pengorbanan kalian yang tidak dapat terukur kepadaku.

Untuk Adikku tersayang Hafizian Alrafaeyza Rianda

Terima kasih telah lahir ke dunia memberikan kenangan – kenangan yang baik dan selalu memberikan kehangatan, keceriaan serta kekuatan dalam setiap langkahku.

Untuk Keluarga Besarku

Terima kasih telah memberikan dukungan, do'a serta motivasi dalam setiap prosesku.

Orang-orang baik yang telah memberikan bantuan dan dukungan

Terima kasih atas segala kebaikan yang tidak dapat ku balas satu persatu, semoga menjadi keberkahan dan dihitung pahala oleh Allah SWT.

SANWACANA

Alhamdulillah, Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah serta memberikan kekuatan sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **"Optimasi Ekstraksi DNA**

***Pseudonocardia carboxydivorans* 18A21301 Yang Berasal Dari Tunikata Dengan Kit Ekstraksi Promega Dan Qiagen"** sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Sains pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Sholawat serta salam selalu tercurah kepada Rasulullah SAW. Selama proses penyusunan skripsi ini, penulis banyak menerima bantuan, dukungan, motivasi, bimbingan, saran, kekuatan, arahan serta masukan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar – besarnya kepada :

1. Bapak Dr. Eng. Heri. Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Jani Master, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
3. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. selaku Kepala Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lampung
4. Alm. Ibu Dra. C.N. Ekowati, M.Si. selaku dosen pembimbing I, yang telah membimbing dan memberikan arahan kepada penulis untuk menulis tugas akhir ini.
5. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah sabar memberikan arahan, saran serta masukan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Bapak Wawan Abdullah Setiawan, M.Si. selaku dosen pembimbing II dan Pembimbing Akademik yang telah sabar membimbing, memberikan

nasihat, masukan, saran serta motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

7. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. selaku dosen penguji yang telah sabar memberikan saran serta masukan kepada penulis.
8. Bapak ibu dosen yang tidak bisa penulis sebutkan satu – persatu, terimakasih atas segala ilmu dan telah diberikan selama proses perkuliahan.
9. Staf Laboran Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila Oni Mastuti Atas segala ilmu, saran, masukan, bantuan serta kebersamaannya selama proses perkuliahan.
10. Seluruh Staf administrasi dan pegawai Jurusan Biologi Fmipa Unila.
11. Kedua orang tua Ayahanda Rusli Rianda dan Ibu Hapsari Palupi. Salah satu orang tua terhebat yang selalu dapat menjadi rumah bagi penulis untuk pulang, penyemangat serta selalu memberikan doa-doa terbaiknya kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
12. Adik tersayang Hafizian Alrafaeyza Rianda. Terimakasih telah hadir ke dunia memberikan kesan, pengalaman, dan keceriaan serta kekuatan untuk melangkah sehingga skripsi ini terselesaikan, I love u dek.
13. Keluarga besar Eyang Maharsi. Terimakasih atas motivasi, saran, masukan, doa dan dukungan yang tiada henti diberikan kepada penulis.
14. Sepupuku Danar Jati Prasetyo. Terimakasih atas kebersamaan, dukungan, kekuatan, motivasi, saran serta waktu yang selalu diberikan kepada penulis.
15. Sahabat terbaik semasa kuliah Naila Ulya Azhari, Leni Agustin, Dilla Nurlela, Upik Mailiani, Salimah Joharian Nuraini, Siska Emilia Putri, Mala Irma Pramita, Roni Setiawan, Ayuni Mitra Sari, Viki Ramadan, Muhammad Ilyas, Emilia, Mutia Farida Salsabela terimakasih telah menemani perjalanan penulis selama masa perkuliahan.
16. Sahabat SMA, Fajar Hendra Jaya dan Monica Pricilia yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.

17. Kakak tingkat Biologi 2017, 2018 dan seluruh Wadya Balla Himbio yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Terimakasih kebersamaan dan pembelajaran yang sangat berarti bagi penulis.
18. Sahabat seperjuangan Biologi angkatan 2019 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.
19. Yusril Rachman Nendy Subing yang menemani dalam setiap proses. Terimakasih atas kesabaran, dukungan, masukan, saran, kekuatan serta do'a yang selalu diberikan kepada penulis.
20. Almamater tercinta Universitas Lampung.
21. Semua pihak terkait yang telah membantu, mempermudah dan mendo'akan penulis dalam menyelesaikan perkuliahan.
22. Syifa Riandani Azzahra selaku diri sendiri. Terimakasih telah kuat dan bertahan sampai sejauh ini.

Semoga Allah membalas kebaikan dan keikhlasan semua pihak yang telah terlibat dalam proses penyusunan skripsi. Penulis memohon maaf dan menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna dalam penulisan skripsi ini. Akan tetapi, besar harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
RIWAYAT HIDUP	vi
MOTTO.	viii
PERSEMBAHAN.....	ix
SANWACANA	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Kerangka Pemikiran.....	3
1.4 Hipotesis	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tunikata	5
2.2 <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	6
2.3 DNA (Deoxyribo Nucleic Acid).....	9
2.4 Gen 16s rRNA.....	11
2.5 Isolasi DNA (<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>)	13
2.6 Metode <i>Double Spin Column</i>	14

2.7	Kit Ekstraksi Promega	15
2.8	Kit Ekstraksi Qiagen	17
2.9	<i>Implen NanoPhotometer</i>	18
2.10	Metode Uji Keberhasilan Ekstraksi DNA.....	19
III.	METODE PENELITIAN.....	21
3.1	Waktu dan Tempat.....	21
3.2	Alat dan Bahan.....	21
3.3	Rancangan Penelitian.....	22
3.4	Prosedur Kerja	22
3.4.1	Rekultur Isolat <i>Actinobacteria</i>	22
3.4.1.1	Pembuatan Media Koloid Kitin	22
3.4.1.2	Pembuatan Media ISP-2	22
3.4.1.3	Peremajaan Isolat <i>Actinobacteria</i>	23
3.4.1.4	Identifikasi Isolat <i>Actinobacteria</i>	23
3.4.1.5	Kultivasi Actinomycete	24
3.4.2	Isolasi DNA dengan <i>Qiagen</i>	24
3.4.3	Isolasi DNA dengan Promega	25
3.4.4	Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA	26
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1	Pengkodean Nama Isolat	27
4.2	Peremajaan Isolat <i>Actinobacteria</i>	27
4.3	Identifikasi Isolat <i>Actinobacteria</i>	29
4.4	Kultivasi Isolat <i>Actinobacteria</i>	30
4.5	Pengukuran konsentrasi menggunakan nano fotometer nandrop	32
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	35
5.1	Kesimpulan.....	35
5.2	Saran	35
	DAFTAR PUSTAKA	36
	LAMPIRAN.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. lokasi <i>shipon</i> tunikata.....	6
Gambar 2. Siklus hidup <i>Actinobacteria</i>	9
Gambar 3. (a) DNA double helix, (b) Struktur kimia DNA, (c) model 3D DNA. 10	10
Gambar 4. Kit Ekstraksi Promega.....	15
Gambar 5. Kit Ekstraksi Qiagen	17
Gambar 6. <i>Implen NanoPhotometer</i>	19
Gambar 7. Visualisasi koloni <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> secara makroskopis.....	27
Gambar 8. Hasil pengecatan Gram <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	29
Gambar 9. Hasil kultivasi isolat <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> dalam erlenmeyer.....	31
Gambar 10. Persiapan Ekstraksi DNA.....	48
Gambar 11. Proses pelarutan inokulum	48
Gambar 12. Penggerusan NaOH	49
Gambar 13. Proses ekstraksi DNA.....	49
Gambar 14. Proses sentrifugasi larutan DNA	50
Gambar 15. Hasil presipitasi DNA	50

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil perbedaan konsentrasi yang dihasilkan dari kedua kit ekstraksi qiagen dan promega.....	32
--	----

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luas lautan yang ada dipermukaan bumi diketahui dapat mencapai lebih dari 70%. Lautan memiliki keanekaragaman hayati yang cukup tinggi dan menjadi habitat bagi mikroorganisme seperti spons, tunikata, fitoplankton, makro alga dan lainnya (Mark *et al*, 2017). Tunikata diidentifikasi sebagai sumber potensial senyawa bioaktif sebagai produk alami laut yang menunjukkan berbagai sifat biologis seperti antimikroba dan antikanker. Hubungan simbiosis antara tunikata dan kelompok mikroba tertentu menghasilkan senyawa mikroba yang bertujuan sebagai pertahanan (Chatragadda *et al.*, 2020).

Tunikata dikenal sebagai salah satu invertebrata laut yang dapat hidup pada kedalaman lebih dari 2 meter, soliter maupun berkoloni, sesil serta hidup sebagai *filter feeder*. Cara hidup seperti ini memungkinkan masuknya mikroorganisme lain seperti bakteri dapat masuk ke dalam tubuh tunikata melalui *branchial* siphon (Diah dkk, 2020). Diketahui bahwa tunikata yang berasosiasi dengan mikroorganisme lain menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri, antitumor, antikanker, hemolitik, antiangiogenik serta sitotoksik (Dhisa *et al.*, 2021).

Actinobacteria telah diakui sebagai salah satu sumber penting bagi senyawa bioaktif alami yang menghasilkan lebih dari 10.000 senyawa bioaktif (Shanti dkk., 2016). Isolasi DNA diperlukan sebagai tahapan awal

dalam mengidentifikasi kekerabatan genetik dan mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh suatu organisme. Isolasi DNA dikenal sebagai sebagai suatu proses untuk memisahkan DNA dari komponen lainnya seperti RNA dan protein (Sri dkk, 2021). DNA adalah polinukleotida untai ganda yang memiliki karakteristik berupa komponen penyusun yang terdiri atas adenin, guanin, timin serta sitosin. DNA terbentuk dari susunan rangkaian nukleotida yang terhubung melalui ikatan fosfodiester yang terbentuk dari gugus fosfat dan gula pentosa. Sedangkan untai DNA terhubung dari ikatan hidrogen yang terbentuk melalui pasangan basa nitrogen (Siti Nur'aini dkk, 2019).

Dalam mengisolasi DNA terdapat beberapa tahapan yang harus dilakukan. Adapun tahapan utama dalam mengisolasi DNA diantaranya isolasi atau pemanenan sel, lisis sel (penghancuran sel), penghilangan protein dan RNA (ekstraksi), purifikasi (pemurnian DNA) serta presipitasi (pengendapan DNA). Tahapan pemanenan sel dilakukan dengan sentrifugasi dimana prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat molekul menggunakan gaya sentrifugal. Substansi yang lebih berat (natan) akan mengendap didasar sedangkan substansi yang lebih rendah (supernatan) akan berada di lapisan atas. DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi ini biasanya disebut dengan template DNA (Tiara dan Sugireng, 2019).

Belum diketahuinya keefektivitasan dari penggunaan kit ekstraksi yang berbeda antara kit ekstraksi promega dan qiagen dalam melakukan estraksi DNA khususnya DNA bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans* sehingga pada penelitian ini dilakukan optimasi ekstraksi DNA bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans* dari genus *Actinobacteria* yang berasal dari tunikata dengan menggunakan kit ekstraksi qiagen dan promega. Dari hasil yang didapat diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan penggunaan kit ekstraksi yang lebih efisien dan template DNA dapat digunakan untuk pengamatan lebih lanjut. Hingga saat ini, metode

ekstraksi DNA yang dikembangkan umumnya diikuti dengan konsekuensi dan biaya yang meningkat. Beberapa hal menjadi kendala adalah pada lamanya waktu ekstraksi DNA dikarenakan harus menunggu cukup lama guna mendapatkan sampel yang baik.

1.2 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui perbedaan hasil konsentrasi dan kemurnian berdasarkan perbedaan kit ekstraksi.
2. Mengetahui keefektivitasan serta efisiensi dari perbedaan penggunaan kit ekstraksi qiagen dan promega.

1.3 Kerangka Pemikiran

Tunikata merupakan salah satu invertebrata laut yang hidup pada kedalaman 2 meter, hidupnya dapat berkoloni maupun soliter serta hidup sebagai *filter feeder* seperti tunikata. Dengan cara hidup ini, memungkinkan mikroorganisme lain seperti bakteri maupun jamur masuk kedalam tubuh tunikata melalui *branchial siphon* yang dimilikinya. Setelah mikroorganisme seperti jamur dan bakteri masuk ke dalam tubuh tunikata, mereka mampu hidup bersama dengan melakukan asosiasi. Hasil dari berasosiasi nya mikroorganisme lain seperti jamur dan bakteri dengan tunikata yaitu adalah senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan dari asosiasi tunikata dengan *Actinobacteria* dinilai memiliki aktivitas senyawa antimalaria, antikanker, antivirus, antibakteri serta antitumor.

Salah satu mikroorganisme yang berasosiasi dengan tunikata adalah *Actinobacteria* atau *Actinobacteria* yang beranggotakan bakteri Gram positif seperti *Pseudonocardia carboxydovorans*. Bakteri ini dilaporkan sampai saat ini telah menghasilkan 10.000 senyawa bioaktif dan masih akan terus mengalami kenaikan seiring perkembangan teknologi dan

penelitian. Tahap awal dalam mengidentifikasi senyawa bioaktif suatu bakteri adalah dengan melakukan isolasi DNA. Dalam mengisolasi suatu DNA bakteri diperlukan adanya penggunaan kit ekstraksi yang efisien dan efektif sehingga penelitian ini dilakukan guna mengetahui keefektivitasan dan keefisienan penggunaan antara kit ekstraksi promega dan kit ekstraksi qiagen dalam mengisolasi DNA bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans*.

1.4 Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perbedaan penggunaan kit ekstraksi berpengaruh pada hasil konsentrasi dan kemurnian DNA.
2. Perbedaan penggunaan kit ekstraksi berpengaruh pada efektivitas dan efisiensi isolasi DNA.

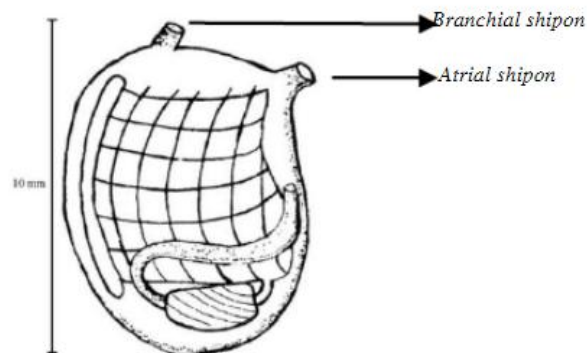
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tunikata

Urochordata berasal dari kata latin yaitu *uri* yang berarti ekor dan *chordata* yang berarti batang yang berarti hewan yang memiliki penyokong tubuh dibagian ekornya. Hewan ini memiliki tunicin yang berada pada kulitnya (Burhanuddin, 2018). Tunikata tergolong kedalam hewan yang berbentuk tabung dan tubuhnya ditutupi oleh mantel (*tunic*) (Ni made dkk, 2019). Tunikata masuk kedalam filum chordata primitif yang memiliki ± 3.000 spesies (Santhanam dkk, 2020).

Tunikata bertahan hidup dengan *mucus filter feeder* dimana ia akan mengekstrak partikel sekecil $0,5 \mu\text{m}$ yang seukuran dengan kerongkongannya. Partikel makanan kemudian dikumpulkan oleh *mucus* dan dialirkan ke lambung oleh silia. Aliran makanan yang berada di kerongkongan diciptakan oleh silia yang berada pada saluran yang terletak pada kedua sisi stigma di kantung *branchial*. Jaring makanan yang terbuat oleh serat mukus mampu menjebak partikel berukuran sampai $3\mu\text{m}$. Dengan cara ini, bukan hanya partikel makanan yang dapat terserap kedalam tunnikata melainkan mikroorganisme lain dapat terperangkap ke dalam tubuh tunikata (Diah dkk, 2020). Pada tunikata terdapat *branchial siphon* dan *atrial siphon* yang mengarah keatas. *Branchial siphon* terletak tegak lurus dan *atrial siphon* berada pada sisi lateral. Makanan akan masuk melalui *branchial siphon* yang akan didistribusikan ke seluruh tubuh dan kemudian akan dikeluarkan melalui *atrial siphon* (Ali dan Tamiselvi,

2016). Adapun lokasi *branchial siphon* dan *atrial siphon* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. lokasi *shipon* tunikata (Ali dkk, 2016).

Tunikata yang berasosiasi dengan mikroorganisme lain memiliki manfaat yang besar guna keberlanjutan hidup manusia diantaranya mampu menghasilkan senyawa bioaktif. Namun, tunikata juga memiliki beberapa pengaruh negatif bagi mikroorganisme lain seperti tunikata akan mengambil makanan mikroorganisme lain yang hidupnya menempel atau dekat dengan tunikata. Hal ini dikarenakan tunikata bersifat *filter feeder*. Selain itu, tunikata juga dapat menempel pada lambung kapal menyebabkan pemborosan bahan bakar kapal dikarenakan bobot kapal semakin berat (Gewing, 2016). Tunikata biasanya menghuni perairan litoral dan zona intertidal dan subtidal serta sebagian besar hidup sesil ataupun menempel pada terumbu karang (Tahir, 2016). Tunikata yang hidup pada terumbu karang diketahui mengandung senyawa kimia yang bermanfaat sebagai agen antitumor, antimikroba, antikanker dan anti inflamasi (Magdalena, 2018). Tunikata memiliki peran ekologis sebagai biota laut yang berkontribusi dalam menjaga kestabilan ekosistem laut (Rensi dkk, 2022).

2.2 *Pseudonocardia carboxydivorans*

Anggota genus *Pseudonocardia* termasuk kedalam genus *Actinobacteria* yang memiliki ciri bakteri Gram positif, aerob dan banyak ditemukan pada lingkungan, tanah maupun tanaman dan merupakan anggota famili

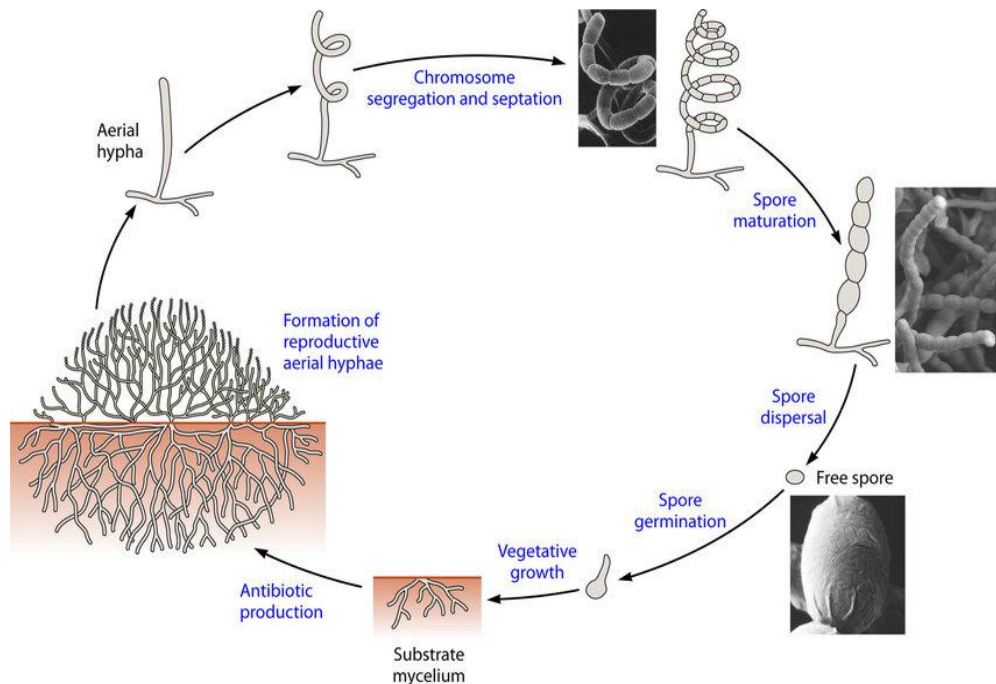
Pseudonocardia (Hanieh *et al.*, 2021). *Pseudonocardia carboxydivorans* merupakan *Carboxydobacteria*. *Carboxydobacteria* adalah kelompok bakteri aerob yang dapat tumbuh aerob pada CO (Karbon monoksida) sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Strain bakteri Y8^T mampu mengoksidasi karbon monoksida yang diisolasi dari sampel tanah (Amalia *et al.*, 2017). Genus *Pseudonocardia* pertama kali ditemukan dipublikasikan oleh Henssen tahun 1957. Genus ini terdiri dari 27 spesies dan memiliki karakter yaitu terdapat miselia vegetatif dan miselia aerob dengan rantai spora yang dihasilkan oleh tunas atau fragmentasi *acropetal*, asam mesok-diaminopilemat, arabinosa dan galaktosa dalam peptidoglikan (komposisi dinding sel tipe -14), MK-8(H₄) sebagai *menaquinone* utama dan memiliki DNA G+C sebesar 68-79 mol% (Lee *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002).

Genus *Pseudonocardia* memiliki strain Y8^T yang membentuk substrat berwarna coklat dan miselium udara berwarna putih. Miselium udara terfragmentasi menjadi spora berbentuk batang yang permukaannya halus. Dilakukan pengecatan Gram dan uji fisiologis guna mengetahui karakteristik yang dimiliki genus *Pseudonocardia* dan diamati pemindaan melalui mikroskop elektron dari kultur *Pseudonocardia* berumur 14 hari yang ditumbuhkan pada media bennett. Didapatkan bahwa genus *Pseudonocardia* termasuk ke dalam bakteri Gram positif dan termasuk bakteri aerob (Sae *et al.*, 2008). Menurut Hikmawati (2018) karakteristik umum *Actinobacteria* diantaranya memiliki miselium yang menghasilkan spora berdinding tipis, spora yang dihasilkan bervariasi seperti bentuk dan ukuran serta jaringan hifa *Actinobacteria* umumnya tumbuh dengan baik di permukaan padat seperti agar. Bakteri pada umumnya diklasifikasikan berdasarkan kedekatan genetik dan kemiripan morfologi.

Adapun klasifikasi bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans* sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Filum : Actinomycetota
 Ordo : Actinobacteria
 Family : Pseudonocardiaceae
 Genus : *Pseudonocardia*
 Spesies : *Pseudonocardia carboxydivorans* (sumber :
<https://bacdive.dsmz.de/strain/13399>, diakses 01 September 2023).

Spesies *Pseudonocardia carboxydivorans* masuk kedalam genus *Actinobacteria* dimana genus ini diketahui memiliki ciri khas Gram positif seperti filamen yang membentuk spora dan dapat tumbuh pada suhu berkisar 25-30°C. Bakteri ini memiliki siklus pertumbuhan dimulai dari spora yang menyesuaikan diri pada lingkungan. Spora akan matang apabila merasa lingkungan yang didapatkan menunjang untuk pertumbuhannya dan kemudian berkecambah dengan membentuk spora vegetatif dan menghasilkan miselium primer seperti miselium substrat yang berperan sebagai penyerap nutrisi dari media. Miselium primer akan berkembang menjadi miselium sekunder yaitu *aerial hyphae* yang akan tumbuh pada permukaan media dan tumbuh secara melingkar apabila kekurangan unsur hara. Septa terbentuk diantara hifa vegetatif yang matang serta membentuk rantai spora. Spora terbentuk dikarenakan terjadinya fragmentasi atau pembengkakan hifa. Spora akan dipisahkan dari hifa vegetatif serta akan hidup di lingkungan bebas (Barka *et al.*, 2016). Adapun siklus hidup *Actinobacteria* dapat dilihat pada gambar 2.

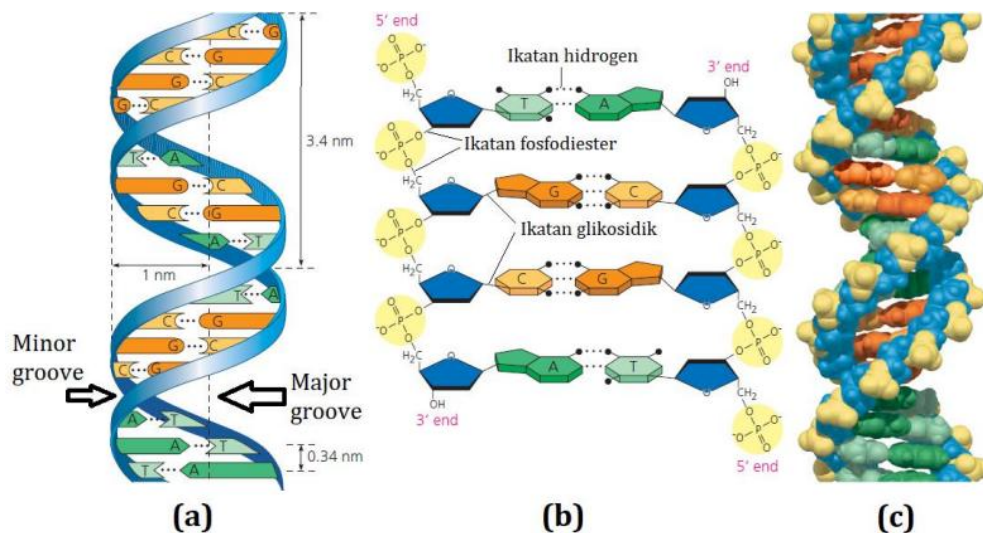


Gambar 2. Siklus hidup *Actinobacteria* (Barka *et al.*, 2016).

2.3 DNA (Deoxyribo Nucleic Acid)

DNA atau dikenal dengan *Deoxyribo Nucleic Acid* dikenal sebagai makromolekul yang tersusun atas nukleotida sebagai molekul dasar pembawa sifat gen. Pada umumnya bentuk DNA yaitu polimer yang tersusun atas monumer-monumer yang biasa disebut nukleotida. Nukleotida sendiri terdiri dari 3 komponen diantaranya gula pentosa, fosfor serta basa nitrogen. Sedangkan basa nitrogen terdiri atas Purin dan Pirimidin. Basa nitrogen Purin terdiri atas Adenin (A) dan Timin (T) sedangkan basa nitrogen pirimidin terdiri atas Cytosin (C) dan Guanin (G). Nukleotida penyusun DNA akan tersusun rapih dengan diikat oleh ikatan fosfodiester. Ikatan fosfodiester merupakan suatu ikatan yang menghubungkan antara dua gugus fosfat. Arah DNA selalu di tunjukkan dari gugus 5 ke gugus 3 hal ini berdasarkan ikatan hidroksil yang dimulai dari gugus 5 dan dilanjutkan ke nukleotida selanjutnya pada gugus ke 3 melalui ikatan fosfodiester (Miftahul, 2019). Gula dari DNA mengalami kekurangan satu atom oksigen pada atom karbon dari OH menjadi H sehingga membedakan DNA dari RNA (Youssef *et al.*, 2019). DNA memiliki peran

sebagai penyimpanan informasi genetik. DNA yang merupakan gudang informasi genetik, tidak hanya terdapat pada kromosom tetapi juga di mitokondria. Semua asam nukleat dibentuk oleh komponen nukleotida yang terdiri dari basa, gula dan fosfat (Sri, 2016). Adapun model DNA dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. (a) DNA double helix, (b) Struktur kimia DNA, (c) model 3D DNA (Mustika dkk, 2020).

Beberapa ciri dan struktur model DNA diantaranya sebagai berikut.

1. Molekul DNA tersusun dari dua untai rantai polinukleotida yang saling memilin pada sumbu yang sama panjang dan membentuk sepasang untai putar-kanan.
2. Kedua rantai mempunyai orientasi berlawanan arah (antipararel).
3. Tulang punggung (*back bone*) atau kerangka dengan struktu gula deoksiribosa dan fosfat menyusun DNA yang terletak pada bagian luar molekul sedangkan basa purin dan pirimidin terletak menghadap ke arah dalam sumbu.
4. Kedua rantai *double helix* diikat dengan ikatan hidrogen antara basa A-T dengan dua ikatan hidrogen dan basa C-G dengan tiga ikatan hidrogen.
5. Masing-masing pasangan basa berjarak 0,34 nm dengan pasangan basa berikutnya dan berotasi sebesar 36° . Untai DNA memiliki diameter 2

nm. Diameter untai bersifat konstan dikarenakan basa purin akan selalu berpasangan dengan pirimidin.

6. Untaian DNA mempunyai dua lekukan yaitu lekukan besar (*major groove*) dan lekukan kecil (*minor groove*) kedua lekukan ini berperan sebagai tempat melekatnya molekul protein tertentu (Mustika dkk, 2020).

Nukleotida yang menyusun DNA berperan sebagai penyimpanan serta informasi genetik. Adapun satu nukleotida terdiri atas 3 bagian, diantaranya sebagai berikut.

1. Molekul gula dengan 5 atom C yang disebut pentosa. Gula pada DNA disebut deoksiribosa. Pada DNA atom C nomor 2 berikatan dengan atom H atau kehilangan atom oksigennya sehingga gulanya disebut 2-deoksiribosa. Sedangkan pada RNA atom C nomor 2 berikatan dengan gugus hidroksil (OH).
2. Cincin purin dan pirimidin yaitu suatu basa nitrogen yang terikat pada atom C nomor 1 molekul gula ribosa atau deoksiribosa melalui ikatan glikosidik. Ada dua macam basa nitrogen yang menyusun asam nukleat yaitu basa purin yang terdiri atas adenin (A) dan Guanin (G) serta basa pirimidin yang terdiri atas Timin (T) dan Sitosin (C) serta Urasil (U) pada RNA.
3. Gugus fosfat yang terikat pada atom C nomor 5 gula pentosa melalui ikatan fosfodiester. Gugus fosfat ini menyebabkan asam nukleat bermuatan negatif kuat. Dalam DNA maupun RNA nukleotida berikatan dengan nukleotida yang lain melalui ikatan fosfodiester pada ikatan atom C nomor 3 dari satu molekul gula pentosa dan atom C nomor 5 dari gula pentosa lain. ikatan fosfodiester membentuk tulang opunggang untai asam nukleat (Mustika dkk, 2020).

2.4 Gen 16s rRNA

Gen 16s rRNA adalah suatu gen penyusun ribosom yang memiliki subunit kecil dan sampai saat ini menjadi marka molekular yang digunakan pada identifikasi bakteri yang memiliki ukuran total berkisar 1500 pb (Jhonson

et al., 2019). Gen 16rRNA telah banyak membantu identifikasi bakteri secara akurat. Gen ini bukan saja mengidentifikasi namun juga dapat digunakan arahan dalam mengetahui potensi suatu bakteri (Akihary dkk, 2020).

Salah satu identifikasi bakteri yang paling umum digunakan adalah dengan menggunakan penanda gen 16s rRNA. Panjang gen ini sekitar 1.550 bp dan terdiri dari daerah yang dilestarikan (*conserved regions*). Keuntungan menggunakan gen 16s rRNA ini mampu mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur, waktu yang relatif cepat dan memiliki tingkat akurasi yang tinggi. Adapun kekurangan gen ini diantaranya tidak dapat digunakan untuk spesies tertentu. langkah identifikasi bakteri menggunakan bakteri 16s rRNA secara umum yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi daerah 16S menggunakan PCR, visualisasi gen menggunakan elektroforesis, sekuensing serta mengolah data hasil sekuensing dengan bioinformatika (Shafa, 2021). Adapun gen yang seringkali digunakan dalam mengidentifikasi taksonomi suatu makhluk hidup khususnya bakteri adalah gen 16s rRNA dikarenakan kepraktisan serta kecepatan analisisnya. Hal ini dikarenakan gen-gen lain seperti 23S rRNA dan 5S dianggap lebih sulit diterapkan dalam mengidentifikasi makhluk hidup khususnya bakteri (Akhiry & Kolondam, 2020).

Untuk mengidentifikasi spesies bakteri secara molekuler dapat dilakukan dengan analisis bioinformatika dengan cara menganalisis similaritas gen 16s rRNA sampel dan dibandingkan dengan sekuen referensi yang terdapat pada database *GenBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Syah, 2022). Gen 16s rRNA telah banyak membantu dalam mengidentifikasi berbagai macam jenis bakteri secara akurat selain itu gen 16s rRNA juga dapat digunakan sebaga patokan atau arahan dalam mengetahui potensi yang dihasilkan dari suatu bakteri (Akihary dkk, 2020)

2.5 Isolasi DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*)

Isolasi DNA adalah suatu tahapan memisahkan DNA dari komponen-komponen pengotor lainnya seperti protein, lipid dan polisakarida (Slamet dkk, 2018). Ekstraksi DNA adalah metode pemurnian DNA dengan menggunakan metode fisik dan atau kimia dari sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein dan komponen lainnya. Ekstraksi DNA melibatkan lisis sel dan pelarutan DNA yang diikuti dengan metode kimia atau enzimatis untuk menghilangkan makromolekul seperti lipid, RNA atau protein (Nalini Gupta, 2019). Produk hasil ekstraksi DNA dapat diukur menggunakan spektrofotometer *Nanodrop* guna melihat konsentrasi serta kemurniannya (Dayanti dkk, 2019). Ahmed dkk (2017) menyatakan bahwa metode ekstraksi DNA saat ini telah banyak dikembangkan seperti salah satunya adalah penggunaan NaOH dan metode *boiling* kedua metode ini terbilang cepat, ramah lingkungan, prosesnya cukup mudah serta murah.

Pada dasarnya, ada tiga tahapan ekstraksi DNA diantaranya sebagai berikut.

1. Tahap lisis

Pada tahap ini terjadi penghancuran atau kerusakan membran serta dinding sel. Membran dan dinding sel yang telah terdegradasi akan menyebabkan isi sel keluar. Pada tahap lisis biasanya menggunakan pelarut kloroform guna mendenaturasi protein.

2. Tahap presipitasi

Tahap ini merupakan proses pengendapan DNA yang dibantu oleh etanol absolute atau isopropanol dingin yang berfungsi untuk menghilangkan residu kloroform dan memekatkan DNA. DNA yang telah tercampur etanol dingin akan menggumpal serta membentuk pellet di lapisan bawah.

3. Tahap purifikasi

Tahap purifikasi merupakan tahap pemurnian hasil ekstraksi DNA dalam bentuk pellet. Tahap ini penting dilakukan dikarenakan pellet DNA yang telah dihasilkan masih mengandung sisa kontaminan dari bahan-bahan yang digunakan. Untuk mencuci DNA biasanya menggunakan etanol 70% . Setelah itu, pellet DNA yang telah murni akan dilarutkan dengan buffer TE dengan tujuan menjaga sampel DNA agar tetap stabil (Zulfarina dkk, 2019)

Di dalam dunia molekuler, hasil ekstraksi DNA dengan kualitas serta kemurnian yang baik sangat dibutuhkan. DNA yang telah diekstrak harus terbebas dari berbagai kontaminasi RNA, asam amino maupun protein yang dapat mengganggu kelancaran jalannya proses PCR. Oleh sebab itu, metode ekstraksi DNA yang tepat sangat diperlukan guna mendapatkan ekstrak DNA yang memiliki kualitas serta kuantitas yang baik. Hingga saat ini, metode ekstraksi DNA telah banyak dikembangkan hingga muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA dalam bentuk kit yang dinilai lebih efisien (Agung dkk, 2016).

2.6 Metode *Double Spin Column*

Metode *double spin column* menggunakan membran silika guna memerangkap DNA yang telah keluar dari sel. Metode ini menggunakan reagen khusus yang mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas suatu DNA. Adapun reaksi yang dihasilkan oleh proteinase K dapat melisiskan DNA dari dalam sel sehingga mempermudah dalam proses ekstraksi DNA (Onny, 2015). Sampel yang telah dipreservasi dalam parafin seperti sampel *Human Pappiloma Virus* (HPV) mampu diekstrak menggunakan metode ini. Metode ini secara komersial diproduksi secara komersial oleh beberapa pabrikan dan beberapa merek dagang diantaranya *Dneasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Jerman) dan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, USA) (Chan *et al.*, 2001).

Kelebihan dari digunakannya metode *Double Spin Column* diantaranya pengikatan DNA dengan beberapa larutan buffer khusus mampu menjaga kualitas DNA untuk penyimpanan yang terbilang cukup lama berkisar 2 sampai 3 tahun. Namun, kelemahan dari metode *Double Spin Column* adalah proses ekstraksi DNA yang memerlukan waktu pengerjaan terbilang cukup lama yaitu sekitar 2 jam bahkan dapat lebih dari 24 jam dimulai dengan proses pemecahan sel hingga didapatkan ekstrak DNA (Demeke & Jenkins, 2010; Philips *et al.*, 2012; Tan & Yiap, 2009).

2.7 Kit Ekstraksi Promega

Kit ekstraksi promega memiliki prinsip *salting out* atau biasa disebut dengan penambahan garam. Dengan menggunakan prinsip *salting out* mampu mengganggu ikatan hidrogen molekul DNA (Fernando *et al.*, 2014). Di sisi lain, pada kit promega perlu menambahkan *protein precipitation solution*, isopropanol dan etanol 70% untuk melakukan proses presipitasi dan pencucian yang dilakukan sebanyak tiga kali. Ketiga zat ini dapat menyebabkan perubahan struktur molekul DNA yang kemudian molekul DNA terpresipitasi dari larutan senyawa debris. Senyawa protein mampu diendapkan dengan cara penambahan *protein precipitation solution* sehingga DNA dapat terpisah dengan senyawa protein. Dengan adanya proses presipitasi dan pencucian akan menghasilkan DNA murni (Nurhayati, 2017).



Gambar 4. Kit Ekstraksi Promega (dok. Pribadi, 2023)

Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dan kuat serta memiliki asam teichoic sehingga untuk merusak dinding sel bakteri Gram positif diperlukan penambahan *lysozyme*. *Lysozyme* adalah enzim hidrolitik yang dicirikan kemampuannya untuk memutus ikatan β -(1,4)-glikosidik pada peptidoglikan yaitu komponen struktural utama penyusun dinding sel bakteri (Nida *et al.*, 2022). Salah satu senyawa kimia yang dapat mengurangi kelarutan DNA yaitu isopropanol dingin. Isopropanol tidak dapat melarutkan DNA dikarenakan DNA bersifat polar. DNA akan dicuci menggunakan etanol 70% serta ditambahkan dengan *Rehydration Solution* sebagai tahapan pengawetan DNA agar dapat bertahan lama (Azizah dan Minda, 2022). Pemberian etanol dingin atau alkohol 96% berfungsi pada saat tahap presipitasi dimana DNA tidak akan larut dalam etanol tetapi larut dalam air. Sehingga molekul DNA akan berkumpul atau menggumpal pada bagian atas. DNA akan terlihat seperti serabut-serabut putih yang berada diatas permukaan disebabkan karena massa jenis etanol yang lebih rendah dibandingkan massa jenis air (Herlina dkk, 2021)

Reagen yang digunakan pada kit ekstraksi ini diantaranya *nucleic lysis solution* yang berfungsi untuk menghancurkan membran sel dari suatu bakteri, *protein precipitation solution* berfungsi menggumpalkan protein ataupun sisa-sisa sel dari bakteri setelah proses penghancuran, ethanol berfungsi sebagai presipitasi atau berperan dalam pemurnian DNA dimana ethanol dapat menghilangkan residu-residu garam kemudian DNA *rehydration solution* berfungsi mengendapkan atau merehidrasi DNA bakteri (Fauziyah dkk, 2019).

Menurut Nova (2020) *lysis buffer* berfungsi untuk menghancurkan membran sel dari suatu bakteri. Masa inkubasi yang digunakan sangat berpengaruh terhadap kualitas DNA yang didapat, apabila suhu inkubasi terlalu tinggi dapat merusak DNA sebaliknya jika suhu inkubasi terlalu rendah membran dan jaringan sel suatu bakteri tidak dapat hancur atau lisis. Selain itu, lama waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap hasil ekstraksi. Baik konsentrasi maupun kemurnian DNA yang didapat juga

dapat terpengaruh dari faktor teknis selama pengerjaan isolasi DNA seperti pemindahan isolat, dimana pemindahan isolat harus dilakukan secara teliti agar jaringan-jaringan yang telah hancur yang terletak pada bawah tube tidak ikut terambil, selain itu pengeringan pellet DNA menjadi hal yang wajib diperhatikan disebabkan pengeringan pellet DNA yang kurang sempurna dapat menurunkan nilai kemurnian dan konsentrasi DNA.

2.8 Kit Ekstraksi Qiagen

Ekstraksi DNA menggunakan *mini column* merupakan metode yang paling memungkinkan untuk dilakukan hal ini dikarenakan hasil yang didapat sangat baik serta waktu yang dibutuhkan tidak terlalu lama dibandingkan dengan metode *phenol – chloroporm*. dan juga biaya yang dipakai lebih murah dibandingkan dengan *magnetic-bead* disisi lain, penggunaan kit komersial QiAmp DNA Minikit menggunakan reagen kimia yang cukup banyak dibandingkan dengan metode sederhana (Hong *et al.*, 2010). Dalam isolasi DNA terutama yang berasal dari bakteri baik dari kultur murni maupun sekret makhluk hidup seperti darah menggunakan kit Qiagen dan dapat digunakan dengan alat otomatis (robotik) yang memiliki sifat *closed system* (Riya dkk, 2015).



Gambar 5. Kit Ekstraksi Qiagen (dok. Pribadi, 2023)

Tahapan utama pada ekstraksi DNA menggunakan kit ekstraksi ini adalah tahapan lisis, binding (pengikatan DNA) yang terjadi dengan adanya

membran silika yang terdapat pada *minispin column tube*, wash (pencucian DNA), serta elusi yang menggunakan buffer. *Blotting* merupakan suatu teknik penting yang digunakan untuk mendeteksi rangkaian spesifik DNA, RNA serta protein dari campurannya. Hal ini dilakukan dengan menggunakan membran yang disebut blot. Nitroselulosa merupakan membran yang umum digunakan untuk mendeteksi asam nukleat dan protein. Ciri membran ini adalah memiliki sifat hidrofilik yang baik. Membran ini sering digunakan dalam bidang biomedis dan digunakan sebagai ultrafiltrasi dengan ukuran pori 0,45 dan 0,2 μm (Amin Li *et al.*, 2013). Kit ekstraksi qiagen memiliki prinsip filtrasi DNA atau *minicolumn* dimana DNA akan berikatan dengan membran silika yang berada pada *minispin column tube* dengan adanya bantuan dari garam *chaotropic* dengan konsentrasi tinggi, kemudian kontaminan akan dibuang serta DNA akan dielusi dari membran silika yang terdapat pada *minispin column tube* dengan air atau garam penyangga berkonsentrasi rendah. Kemudian pada tahap elusi akan ada pelepasan DNA dari kolom silika. (Yanti dan Sister, 2019).

Langkah awal dalam mengisolasi DNA menggunakan kit ekstraksi qiagen adalah isolat bakteri diberikan *lysis buffer* yang berfungsi dapat melisiskan sel. Komponen sel seperti protein akan dihancurkan menggunakan enzim protease (proteinase K). Setelah itu DNA akan diendapkan menggunakan etanol absolute difilter dan dicuci dengan wash buffer (buffer AW1 dan AW2). Tahap terakhir DNA akan dilarutkan dalam larutan buffer AE (*elution buffer*). Metode ekstraksi ini sangat lazim digunakan dibanding metode lain dikarenakan waktu yang terbilang cukup singkat (Hong C *et al.*, 2010).

2.9 Implen NanoPhotometer

Implen Nanophotometer merupakan salah satu alat yang digunakan dalam menganalisis konsentrasi suatu senyawa berdasarkan kemampuan

menyerap cahaya dengan suatu metode yang bernama spektrofotometri (Perwitasari dkk, 2020).

Menurut Fatchiyah (2011) prinsip dasar dari spektrofotometri yaitu sampel yang digunakan harus jernih dan larut sempurna sehingga tidak ada suspensi maupun partikel koloid. Cahaya UV dapat diserap oleh pirimidin dan basa-basa purin yang terkandung dalam DNA. Cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm dapat diserap oleh pita ganda DNA sedangkan cahaya UV pada panjang gelombang 280 nm dapat diserap oleh kontaminan phenol atau protein. Dengan adanya perbedaan kemampuan penyerapan cahaya UV membuat kemurnian DNA dapat dihitung dengan cara menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm dan nilai kemurnian berkisar antara 1,8 – 2,0. Menurut Sambrook *et al.*, (1989) rumus perhitungan konsentrasi DNA sebagai berikut.

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/ml)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/ml} \times \text{faktor pengenceran.}$$


Gambar 6. *Implen NanoPhotometer* (dok. pribadi, 2023)

2.10 Metode Uji Keberhasilan Ekstraksi DNA

Keberhasilan suatu proses ekstraksi DNA dapat diuji berdasarkan beberapa metode seperti melalui pengukuran konsentrasi DNA terlarut menggunakan metode spektrofotometri dengan alat yang bernama *Implen NanoPhotometer*. DNA yang telah di ekstraksi wajib diuji untuk melihat

keberhasilan suatu ekstraksi DNA. Salah satu metode yang bisa dilakukan untuk menguji keberhasilan ekstraksi DNA yaitu metode absorbansi (*optical density*) seperti menggunakan alat yang bernama *Implen NanoPhotometer*. *Implen NanoPhotometer* memiliki prinsip menghitung perbedaan penyerapan cahaya UV dimana pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm karena DNA mengandung basa purin serta pirimidin yang dapat menyerap sinar ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm (Fatchiyah dkk, 2012). Sedangkan kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Untuk menghitung nilai kemurnian DNA dapat menggunakan cara absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm. Adapun isolat DNA dapat dikatakan murni apabila rasio absorbansi memiliki rentang antara 1,8 – 2,0 (Thermo Fisher Scientific, 2012). Adapun prinsip dalam pengukuran jumlah atau kadar DNA yaitu menggunakan nano fotometer berdasarkan iradiasi sinar ultra violet (UV) yang diserap oleh nukleotrida serta protein dalam larutan. Penyerapan iridiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA mencapai 260 nm panjang gelombang dan untuk ptotein mencapai 280 nm (Muladno, 2002).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Januari sampai dengan Agustus 2023 di Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: *beaker glass*, gelas ukur, *erlenmeyer*, labu ukur, pipet tetes, *spinbar*, batang pengaduk, tabung reaksi, kaca preparat, corong, cawan petri, kertas saring, gunting, aluminium foil, kapas, mikrotip, plastik wrap, label, tube ujung tumpul, jarum ose bulat, *autoclave*, *laminar air flow*, sentrifuse, mikroskop, *hot plate*, lemari asam serta neraca analitik dan *Implen Nanophotometer*.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: agar, glukosa, malt ekstrak, yeast ekstrak, dextrose, air laut, koloid kitin, NaOH 10%, NaOH 5%, alkohol 70%, HCL 1M, HCL pekat, kulit udang, AP 1, Buffer P3, klorofom, es batu, buffer AW1, buffer AW2, buffer AE, blanko (AE), dH₂O, *lysozyme*, *Nucleic Lysis Solution*, *Protein Precipitation Solution*, Isopropanol, *DNA Rehydration Solution*, bakteri *Pseudonocardia carboxydivorans*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan penelitian deskriptif menggunakan 2 kit ekstraksi DNA yaitu kit ekstraksi promega dan kit ekstraksi qiagen. Aktinobakteri uji yang digunakan adalah *Pseudonocardia carboxydovorans*. Hasil ekstraksi akan dianalisis konsentrasi dan kemurnian DNA-nya menggunakan metode spektrofotometri.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Rekultur Isolat *Actinobacteria*

3.4.1.1 Pembuatan Media Koloid Kitin

Kitin dibuat dari limbah cangkang udang. Cangkang udang yang digunakan didapatkan dari Bratasena yang kemudian dihaluskan dan dikeringkan. Sebanyak 20 Gram kulit udang dilarutkan pada 200 ml HCL pekat (37%) dan diaduk selama 2 jam kemudian ditambahkan 1L etanol absolut dingin sambil diaduk hingga terbentuk koloid putih kental. Selajutnya, koloid diatur hingga pH 7 dan disentrifugasi. Endapan dikeringkan hingga berbetuk serbuk. Serbuk koloid kitin digunakan sebagai substrat media sebagai sumber karbon dan nitrogen (Imanda dan Suharjono, 2015).

3.4.1.2 Pembuatan Media ISP-2

Media *International Streptomyces Project* (ISP-2) terdiri dari 4 gr *yeast extract*, 10 gr malt extract, 4 gr dextrose, 2% koloid kitin dan 24 gr agar yang kemudian dilarutkan dalam 1L air laut steril dan di homogenkan menggunakan stirer selama kurang lebih 15 menit, kemudian di sterilkan kembali menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dengan 1 atm.

Kemudian setelah suhu mulai turun, ditambahkan sikloheksamida sebanyak 25 ng/mL dan dituang kedalam cawan petri ataupun tabung reaksi (Shanti dkk, 2016).

3.4.1.3 Peremajaan Isolat *Actinobacteria*

Actinobacteria yang telah berhasil diperoleh dari medium isolasi, selanjutnya ditumbuhkan pada medium ISP-2 yang terdiri dari 4 gr *yeast extract*, 10 gr *malt extract*, 4 gr glukosa, 2% koloid kitin dan 20 gr agar dalam 1 liter air laut. Kemudian, disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media ISP 2 dituang ke dalam cawan petri untuk mempersiapkan media agar miring. Peremajaan dilakukan dengan mengambil strain yang terdiri dari 1 koloni menggunakan ose bulat kemudian dipindahkan pada cawan petri berisi media ISP 2 lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 3 – 4 hari. (Shanti dkk, 2016).

3.4.1.4 Identifikasi Isolat *Actinobacteria*

Isolat *Actinobacteria* diamati morfologinya secara makroskopik melalui uji pewarnaan Gram, isolat diambil menggunakan ose dan ditambahkan cairan aquades diatas kaca preparat kemudian dilakukan fiksasi. Setelah difiksasi, ditambahkan kristal violet dan diamkan selama 1 menit, kemudian dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Setelah itu, ditambahkan alkohol 96% lalu diamkan selama 20 detik dan bilas kembali menggunakan aquades, setelah dikeringkan ditambahkan safranin dan didiamkan kembali selama 20 detik selanjutnya dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Kemudian diamati menggunakan mikroskop (Dayang dkk, 2019).

3.4.1.5 Kultivasi *Actinomycete*

Kultivasi *Actinobacteria* dilakukan pada media ISP 2 cair. Kultur murni *Actinobacteria* ditumbuhkan dalam erlenmeyer yang berisi media hasil inokulum ISP 2 cair dan diinkubasi selama 3-7 hari pada suhu 28°C serta diletakkan pada shaker inkubator guna meminimalisir spora aerial.

3.4.2 Isolasi DNA dengan *Qiagen*

Isolasi DNA menggunakan *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)*. *Actinobacteria* ditumbuhkan pada media ISP 2 cair dengan perlakuan shaker hingga umur 3–7 hari guna meminimalisir spora aerial. Kemudian, sampel inokulum dipindahkan ke tube tumpul sebanyak 2–3 ml dan disentrifus dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit 4°C. Ditambahkan ± 400 μ l AP 1 dan kemudian tissue lyser selama 2 menit. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit dan setiap 5 menit dibolak-balik. Ditambahkan 150 μ l buffer P3 dan 150 μ l kloroform dengan metode inversi lalu dipindahkan ke tube lancip kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu dingin. Selanjutnya, inokulum disentrifus kembali dengan kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C hingga terbentuk 3 lapisan dan diambil lapisan teratas. Setelah lapisan teratas terambil, dipindahkan ke tube Dneasy warna ungu sebanyak ± 500 μ l dan disentrifus kembali dengan kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit.

Supernatan sebanyak ± 500 μ l dipindahkan ke tube lancip baru pada kondisi dingin secara hati-hati supaya tidak menyentuh natan. Kemudian, supernatan ditambahkan buffer AW1 sebanyak 1,5 ml dan dihomogenkan menggunakan teknik inversi. Setelah itu, sebanyak 500 μ l larutan dipipet dan dimasukkan ke dalam tube *Dneasy Column* putih dan disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 8000 rpm selanjutnya supernatan dibuang tanpa menyentuh bagian bawah filter dan dilakukan pengulangan sentrifus 1 kali selama satu menit guna memastikan tidak ada lagi pelarut. Setelah itu, dipindahkan filter ke *collection tube* yang baru dan ditambahkan buffer

AW2 sebanyak 500 µl lalu disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan buang cairan pada tube bawah. Dilakukan pengulangan dengan menambahkan buffer AW2 sebanyak 500 µl dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit dan cairan pada tube bawah dibuang. Filter *Dneasy column* dipindahkan ke tube lancip yang baru kemudian ditambahkan buffer AE 35 µl dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya disentrifus selama 3 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 8000 rpm. Langkah selanjutnya adalah diuji menggunakan spektrofotometer nandodrop menggunakan blanko (AE) yang diambil sebanyak 1,5 µl dimasukkan kedalam kuvet untuk tahap selanjutnya menggunakan nanofotometer (Qiagen, 2023).

3.4.3 Isolasi DNA dengan Promega

Biakan *Actinobacteria* pada media cair ISP 2 yang telah dikultivasi selama 3-7 hari kemudian ditambahkan NaOH sebanyak 0,05 gram dan kemudian dipindahkan secukupnya ke tube 1,5 ml ujung tumpul. Kemudian, disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 2 menit dengan suhu 4°C dan supernatan dibuang perlahan. Dilakukan resuspensi sel menggunakan ddH₂O sebanyak 480 µl setelah itu ditambahkan lysozyme sebanyak 20 µl dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian, setelah diinkubasi disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 16.000 rpm lalu supernatan dibuang. Ditambahkan *Nucleic Lysis Solution* sebanyak 600 µl kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Diinkubasi pada suhu 65 °C selama 15 menit dan setiap 5 menit dibolak-balik perlahan kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan *Protein precipitation solution* sebanyak 200 µl dan dihomogenkan kembali menggunakan vortex lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit. Disentrifus kembali dengan kecepatan 16.000 rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang dengan hati-hati pada kertas saring atau tissue lalu natan ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 600 µl dengan cara dibolak-balik berfungsi untuk mencucui pellet DNA. Setelah itu, disentrifus kembali selama 2 menit dengan kecepatan 16.000 rpm kemudian tabung ditiriskan diatas kertas penyerap bersih serta

natan dibiarkan mengering pada suhu ruang selama 10-15 menit.

Selanjutnya, ditambahkan DNA *Rehydration Solution* sebanyak 30 µl ke dalam tabung lalu DNA direhidrasi dengan cara diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C (Promega, 2023).

3.4.4 Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Adapun langkah pertama dalam penggunaan *Implen NanoPhotometer* adalah hubungkan *Implen NanoPhotometer* dengan sumber tenaga dan tombol power ditekan, tunggu hingga tampilan menjadi “smart start menu”, masukan blanko aquades (bagian bening menghadap ke depan) dan dimasukkan kedalam alat *Implen NanoPhotometer*. Dipilih “test DNA”, enter lalu pilih tombol “run test”, tekan tombol c dan pilih “measure blank”, tekan tombol a dan blanko aquades dikeluarkan kemudian masukan blanko sampel. Pilih “measure sample” setelah itu, nilai yang muncul pada monitor dicatat (Muhammad dkk, 2016). Sampel DNA yang telah diisolasi kemudian diambil sebanyak 5 µl dan diteteskan pada kuvet *Implen NanoPhotometer*. Setelah itu akan muncul grafik terkait konsentrasi dan kemurnian DNA pada (Agung dkk, 2016).

Salah satu uji keberhasilan DNA adalah dengan cara uji kuantitatif untuk melihat konsentrasi dan kemurnia DNA menggunakan alat *Implen NanoPhotometer* berbasis spektrofotometri. Pada dasarnya prinsip kerja *Implen NanoPhotometer* ini adalah DNA murni mampu menyerap sinar ultraviolet dikarenakan adanya basa purin dan pirimidin (Fatchiyah *et al.*, 2011). Menurut Sambrook *et al.*, (2001) untuk melihat kemurnian hasil ekstraksi DNA ialah berupa nilai kemurnian DNA pada A260/A280.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Konsentrasi dan kemurnian pada kit ekstraksi qiagen relatif lebih besar yaitu 1,989 dan 2,000 dibandingkan pada kit ekstraksi promega yaitu 1,943 dan 1,500.
2. Waktu pengerjaan dengan kit ekstraksi qiaegn relatif lebih singkat berkisar 35 menit dibandingkan pengerjaan optimasi kit ekstraksi promega yang waktu pengerjaannya berkisar 2 jam 30 menit.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan kit ekstraksi lain untuk lebih meyakinkan keefektivitasan dan efisiensi penggunaan perbedaan kit ekstraksi untuk mendapatkan template DNA yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung Pambudiono, Endang Suarsini dan Mohamad Amin. 2012. Isolasi Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium Dari Limbah Cair Penepungan Agar. *Seminar Nasional Pendidikan*. Hal: 103.
- Agung Pambudiono, Endang Suarsini dan Mohamad Amin. 2016. Isolasi DNA Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium Dari limbah Cair Penepungan Agar. *Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek*. Hal. 104.
- Zulfarina, Imam Mahadi. 2019. *Buku Ajar Bioteknologi*. Universitas Riau: UR Press.
- Mustika, A. A., Sri, S., Tina, Y., Tinia, L. S.A., Lilik, M. 2020. Modul Pembelajaran Biologi Madrasah Aliyah. Direktorat Guru dan Tenaga Kependidikan Madrasah. Hal: 20-22.
- Miftahul Mushlih. 2019. Buku Ajar Mata Kuliah Biologi Molekuler “Aplikasi di Dunia Kesehatan”. Sidoarjo: Umisda Press. Hal: 43.
- Agustina Dini, Diana Chusna Mufida, Hanifa Riski A.S, Dion Khriasmashologi. 2019. Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap *Staphylococcus Aerus* Yang Terdeteksi Dalam Sputum Pasien Dengan *Pneumonia* Yang Dirawat Di Rumah Sakit. *Journal of Agromedicine and Medical Science*. Vol.10(1):20-24.
- Ahmad Thontowi, Kusmiati dan Nuswantara. 2007. Produksi β -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada Air-Lift Fermentator. *Jurnal Biodiversitas*. 8(4) : 253-256.
- Ahmed, M & Abdul Malik. 2011. Bioaccumulation of Heavy Metal by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriology Journal*. 2: 1-10.
- Ahmed, O. B. dan Dan Anas S. 2017. Quality Improvement of the DNA Extracted by Boiling Method in Gram Negative Bacteria. *International Journal of Bioassays*. 6(4).

- Aimin Li., Yadong, W., Lijuang, D., Xinmei, Z., Qun, Y., Yidong, C., Jianhua, L., Yang, B., Side, L., Yall, Z. 2013. Use of Nitrocelullulose Membran as a Scaffold in cell culture. *Cytotechnology Journal*. 65(1): 71-81.
- Akihary, Claudia Valleria dan Beivy Jonathan Kolon. 2020. Pemanfaatan Gen 16s rRNA Sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian Di Indonesia. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 9(1): 16.
- Aristya, Ganies Riza, Agriansyah, Ahdiat, Daryono dan Budi Setiadi. 2013. Deteksi dan Skrining Pewarisan Sifat Ketahanan Penyakit Powdery Mildew Pada Generasi Backcross Tanaman Melon (*Cucumis melo*). *Jurnal Ilmiah Biologi*. 6(2): 124-130.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley.
- Azizah dan Minda Azhar. 2022. Identifikasi Gn 16S Rrna Bakteri Asam Laktat UBC-DTK-01 dari Dadih. *Chemistry Journal of Universitas Negeri Padang*. Vol 11(2). ISSN: 2339-1197.
- Bacdiver. 2022. *Pseudonocardia carboxydvorans* Y8 is an aerobe, spore-forming, mesophilic bacterium that was isolated from soil (<https://bacdiver.dsmz.de/strain/13399>). Diakses tanggal 02 September 2023 pukul 21.08 WIB.
- Bacterial genomic DNA. *African Journal of Microbiology Research*. 8(6), 598-602. DOI: 10.5897/AJMR2013.6459.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., MeierKolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G.P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol*. 80: 1-43.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., GaveauVaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bellard, Maria Gross., Pierre Oudet and Pierre Chambon. 1973. Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mamalian Cells. *European Journal Biochemistry*. 36(1).
- Berdy J. 2012. Thoughts and Facts about Antibiotics: Where We are Now and Where We are Heading. *The Journal of Antibiotics* (65) 385–395.
- Bone DNA Extraction Kit. <https://worldwide.promega.com/>. Diakses tanggal 11 Oktober 2023 pukul 00.55 WIB.
- Burhanuddin, I. A. 2018. Vertebrata Laut. Yogyakarta: Deepublish. 39-41.

- Ni Made, P. M. S., I Dewa, N. N. P., Widiastuti. 2019. Kelimpahan dan Keanekaragaman Tunikata (*Ascidia*) di Perairan Jemeluk dan Penuktukan Bali. *Journal of Marine and Aquativ Science*. 5(1): 11-21.
- Shafa Noer. 2021. Identifikasi Bakteri Secara Molekuler Menggunakan 16S rRNA. *Biological Science and Education Journal*. 1(1): 1-6.
- Santhanam, R. Dan S. Ramesh. 2020. *Biologi dan Ekologi kelautan Farmasi Tunicate*. PerS CRC: Boca Raton.
- Budiarto, Ratno Bugi. 2015. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan dan Peranannya Dalam Diagnostik Kesehatan*. *Jurnal BioTrends*. Vol(6)2. Hal. 29.
- Chan, P., D. Chan, K. To, M. Yu, J. Cheung and A. Cheng. 2001. Evolution of Extraction Method from Paraffin Wax Embedded Tissues for PCR amplification human and viral DNA. *Journal of Clinical Pathology*. 54(5). Pages: 401-403.
- Charan, R, D., G. Schlingman, J. Janso, V. Bernan, X. Feng and G.T. Carter. 2004. Diazepinomicin, A New Antimicrobial Alkaloid From MARINE *Micromonospora* sp. *Journal of Natural Production*. 67(8): 1431-1433.
- Slamet, H., Erlia, N., M. Amien, R. 2018. Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Proceeding Biology Education Conference*. 15(1): 689-692.
- Handayani, Sri Octa., Dwi Putri. 2021. Comparioson of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsium annum* L.) Plant DNA Isolation. *Jurnal Serambi Biologi*. 6(2): 37-41.
- Da Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, and Valente P. 2012. Rapid Yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 55(2): 319-327.
- Dan Liu, Xin-An Zeng, Da-Wen sun and Zhong Han. 2013. Disruption and Protein Release by ultrasonic of Yeast Cells. *Journal Innovative Food Science & Emerging Technologies*. (18) : 132-137.
- Dayanti, Fadla Ghina, Djuminar, Ai, Dermawan, Asep, Tantan, Acep. 2019. Perbandingan Nilai Pengukuran Kualitatif Hasil Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* Menggunakan Metode Boiling, NaOH, Kit Komersial. *Jurnal Riset Kesehatan*. 11(1): 350.
- Demeke, T. And G. R. Jenkins. 2010. Influence of DNA Extraction Methods, PCR Inhibitors and Quantification Methods on Real-time PCR Assay of Biotechnology-derived Traits. *Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396(6). Pages: 1977-1990.

- Dewanta, Aji Dewanta., Miftahul Mushlih. 2021. Perbedaan Uji Kemurnian DNA Menggunakan Nanofotometer UV-Vis dan Nanofotometer Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2. *Indonesian Journal of Innovation Studies*. (15): 9.
- Diah Ayuningrum, Rhesi Kristiana dan Meezan Ardhanu Asagabaldan. 2020. Potensi Bakteri Asosiasi Tunikata Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Guna Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Multidrug Resistent*. *Jurnal Pasir Laut*. 4(2): 103.
- Dian Adhe Bianggo NauE, Karneli, Anton Syailendra, Indriyani, Syafitri, Syafira Wulandari dan Widiyah Julianti. 2022. Buah Bit (*Beta vulgaris* L.) Sebagai Alternatif Safranin Pada Pewarnaan Gram. *Jurnal Kesehatan*. 12(1).
- Disha, V., Jiun, Y. W., Khatijah, Y., Rabiha, S., Swee, H., Kok, S., & Chou, M. (2021). Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine drugs*, 19(5): 246. <https://doi.org/10.3390%2Fmd19050246>.
- Dneasy Blood & Tissue Kits. <https://www.qiagen.com/>. Diakses tanggal 11 Oktober 2023 pukul 01.03 WIB.
- Emilia, Essy, H., & Ashabul, A. (2021). Optimasi Metode Ekstraksi DNA Daun, Kulit Kayu dan Kayu Pinus Merkussi Jungh. Et De Vriese. *Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, 6(4): 766-778. <https://jim.usk.ac.id/JFP/article/view/18233>.
- Fatchiyah, 2011. Pelatihan analisis fingerprinting DNA tanaman dengan metode RAPD. Modul. Malang : Laboratorium sentral ilmu hayati Universtas Brawijaya.
- Fatchiyah, E. L., Arumingtyas, S., & Widyarti, S. Rahayu 2011. Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga
- Fatchiyah, S. Widiyarti, E. L. Arumningtyas, dan S. Permana. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Fauziyah Fadllan, Ai Djuminar, Acep Tantan, Asep Dermawan dan Ernawati. 2019. Perbandingan Ekstraksi DNA *Salmonella thypi* dari Kultur Darah Metode *Spin Column* dan Alcohol Based. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*. 11(2) : 238.
- Fernando, Reiter, A. Rieger dan P. A. D'azevedo. 2014. *Evolution Methods in Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56(1): 29-33.
- Fitriya, Riya Tyas, Muslimin Ibrahim dan Lisa Lisdiana. 2015. Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aerus* dan *Shigella dysenteriae*. *Jurnal Lentera*. Vol(4)1: 87-92. ISSN: 2252-3979.
- Ganjar. 2006. *Mikologi dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.

- Gewing, M. T., Bronstein, O., Nagar, L. R., Granot, I., Frid, O., & Shenkar, N. 2016. First Record of the Non Indigenous Ascidian *Microcosmus Exasperatus*, Heller 1878 in Cyprus. *Journal Marine Biodiversity*. 46(4): 937-941.
- Magdalena Litaay. 2018. Marine Tunicates from Sangkarang Archipelago Indonesia: Recent Finding and Bio-Prospecting. *Journal of Physics: Conference Series*. 1-7.
- Rensi, P., Magdalena, L., Dody, P. 2022. Biodiversity of Tunicate (Ascidaceae) in The Waters of Badi Island, Pangkajene Regency of South Sulawesi. *International Journal of Applied Biology*. 6(1): 149-155.
- Tahir, E., M. Litaay., RG Budji., N. Haedar., Priosambodo dan Syahribulan. 2016. Potensi Tunikata *Rhopalaea* sp. Sebagai Sumber Inokulum Jamur Simbon Antimikroba. *Jurnal Spermonde*. 2(2): 33-37.
- Hasrida Mustafa, Indra Rachmawati dan Yusran Udin. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk. *Jurnal Vektor Penyakit*. 10(1).
- Hasrida, M. I., & Yusran, U. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirotris*. *Vektor Penyakit*, 10(1). 7-9. DOI:10.22435/vektorp.v10i1.6251.7-10.
- He, Q., et al. 1994. Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Journal Biotechniques* 17.1: 82-84.
- Henssen, A. 1957. Beitrage zur Morphologic und Systematic der thermophilen *Actinomyceten*. *Arch Mikrobiol*. Vol(26): 373-414.
- Herlina Rante, M. Natsir Djide, Sartini, Risfah Yulianty, Ermina Pakki, Aisyah Fatmawaty, Rosany Tayeb dan Elly Wahyudin. 2021. Pengenalan Bioteknologi Melalui Pelatihan Isolasi dan Ekstraksi DNA Pada Guru dan Siswa SMA Negeri 13 di Kabupaten Bone Sulawesi Selatan. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*. 5(4): 698-702.
- Hikmawati. 2018. Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Isolat *Actinobacteria* KC 3.1 Dari Rizosfer Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*). Skripsi. Universitas Hasanuddin.
- Hong C, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, Blair D. Siegfried. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *Journal Plos one*. 5(8).
- Hong C, Rangamy M, Sek YT, Haichuan W, Siegfried BD. 2010. Evolution of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *Journal Plos One*. Vol.5(8).

- Huang Y., Wang L., Lu Z., Hong L., Liu Z., Tan G., and Goodfellow, M. 2002. Proposal to combine the genera *Actinobispora* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia* and description of *Pseudonocardia zijingensis* sp. nov. *International Journal System Evol Microbiol.* Vol(52): 977-982.
- Huang, GP.; J. Yuan; L.Sun; Z.G She; J.H. Wu; X.J. Lan; X.Zhu; Y.C. Lin & S.P. Cheb. 2011. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained Between 1985 and 2008. *Journal Mar Drugs.* Vol(9):514-525.
- Huang, Y., Wang, L., Lu, Z., Hong, L., Liu, Z., Tan, G. Y. A. & Goodfellow, M. (2002). Proposal to combine the genera *Actinobispora* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*, and description of *Pseudonocardia zijingensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 977–982.
- Indah Kurniati, Dayang, Puji Ardianingsih dan Risa Nofiani. 2019. Isolasi dan Aktivitas Antibakteri *Actinobacteria* Berasosiasi dengan Koral. *Jurnal Kimia Khatulistiwa.* Vol.8(2): 47. ISSN: 2303-1077.
- Jhonson, S. Jethro, Daniel J. Spakowicz, Bo-Young Hong, Luren M. Petersen, Patrick Demkowicz, Lei Chen, Shana R. Leopold, Blake M. Hanson, Hanako O. Agresta, Mark Gerstein, Erica Sodergren & George M. Weinstock. 2019. Evaluation of 16s Rna Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis. *Journal Nature Communication.* (10): 1-11.
- Joshi, Bheem Dutt., Sudhanshu Mishra., Sujeet Kumar Singh and Sp Goyal. 2013. Metode Efektif untuk Ekstraksi dan Amolifikasi Reaksi Berantai Polimerase (PCR) DNA dari sampel jaringan macam tutul salju yang diawetkan dengan formalin. *Academic Journal.* 12(22): 3399-3404.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150–163.
- Lee, S.D., Kim, E. S., Min, K, L., Lee,W. Y., Kang, S. O and Hah, Y.C. 2001. *Pseudonocardia kongjuensis* sp. nov. Isolated from a glod mine cave. *International Journal Evol Microbiol.* Vol(51): 1505-1510.
- Mark, J., & Chhaya, C. (2017). Marine Biodiversity, Biogeography, Deep-Sea Gradients and Conservation. *Current Biology*, 27(11): 511-527.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.060>.
- Marwayana, Onny Nurrahman. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) Dari Sampel Jaringan Otot. *Jurnal Oseana.* Vol 11(2). ISN:0216-1877.
- Masda, Nur Rahmah. 2018. Potensi Metabolit Sekunder Isolat *Actinobacteria* SM-2 Dari Rizosfer *Andrographis paniculata* Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Skripsi.* Hal. 25

- Minda Azhar, Azizah. 2022. Identifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Asam Laktat UBC-DTK dari Dadih. *Jurnal Periodic*. Vol. 11(2): 32. e-ISSN:2339-1197.
- Mitra Alaey, Rouhangiz Naderi, Ali Vezvaei, Ahmad Khalighi and Alireza Salami. 2005. Comparing Study Between Four Different Methods of Genomic DNA Exraction from *Cyclamen persicum* Mill. *International Journal of Agriculture & Biology*. 7(6).
- Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono dan Nia Kurniawati. 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litoprnaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan*. Vol.791):57.
- Nida, N., Sai, W., Fenghuan, W., Shiza, N., Junaid, R., Maryam, I., Muhammad, U. 2022. Lysozyme and its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. *Journal Molecules*. 27(19): 1-18.
- Muharni, Fitrya dan Sofa Farida. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 7(2).
- Muladno. 2002. Teknologi Rekayasa Genetika. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda-USESE Foundation.
- Nalini Gupta. 2019. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*. 36(2): 116-117.
- Nanik Sulistyani dan Achmad Nuryadin Akbar. 2014. Aktivitas Isolat *Actinobacteria* dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai Penghasil Antibiotik terhadap *Streptococcus aerus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 12(1).
- Ni Putu Dian Pertiwi, Mahardika dan Ni Luh Watianingsih. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili *Psedudochromidae* (DOTTYBACK) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi*. Vol 19(2). Hal. 53. ISSN: 1410-5292.
- Noor Youssef., Aidan Budd., Joseph P Bielawski. 2019. *Journal Methods Molecular Biology*. 3(31).
- Sri Wahyuni. 2016. Genetika Molekuler. Sulawesi: Unimal Press. Hal.26-38
- Nova Triani. 2020. Isoasi DNA Tanaman Jeruk Dengan Menggunakan Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). *Jurnal Teknologi Serapan*. 3(2) : 225.
- Nurhayati, B. dan S. Darmawati. 2017. *Biologi sel dan Molekuler*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

- Nurmalisa Rizko, Hermin Pancasakti Kusumaningrum, Rejeki Siti Ferniah, Sri Pujiyanto, Tia Erfianti, Shelina Nurunnisa Mawarni, Hesti Tri Rahayu dan Dinda Khairunnisa. 2020. Isolasi DNA Daun Jeruk Bali Merah dengan Modifikasi Metode *Doyle and Doyle*. *Jurnal Berkala Bioteknologi*. 3(2): 1-7.
- Omaid Zarei, Siavoush Dastmalchi and Maryam Hamzeh-Mivehroud. 2016. A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces Cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iranian Journal of Pharmaceutcal Research*. 15(4) : 907-913.
- Paula Yague, Maria T Lopez-Garcia, Beatriz Rioseras, Jesus Sanchez and Angel Manteca. 2013. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and Future Perspective. *FEMS Microbial Lett*. 342(2).
- Perwitasari, D. A., Faridah, I. N., Dania, H., Irham, L. M., Salsabila, F. V., & Maliza, R. (2020). Genotype of Potassium Inwardly Rectifying Channel, Subfamily J, Member 11 (KCNJ 11) Gene and Glycaemia Control in Diabetic Patients: A Narrative Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 627–631.
- Philips, K. N. McCallum and L. Weich. 2012. A Comparison of Methods for Forensic DNA Extraction: Chelex-100 and the Qiagen DNA investigator (manual and automated). *Journal Forensic Science International: Genetics*. 6(2): 282-285.
- Pitcher, D. G., Saunders, A., & Owen, R. J. (1989). Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate. *Journal Applied Microbiology*, VIII, 151-156.
- Promega. 2019. Wizard Genomic DNA Purification Kit.
- Putri Fauziana, Sartika. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan *Actinobacteria* Isolat ANL4 2b-3 Untuk Produksi Enzim Protease. *Jurnal Fmipa Unila*. Hal.509. ISSN No. 978-602-98559-1-3.
- Qiagen. 2023. *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*.
- Rabia tanvir, Imran Sajid, Shahida Hasnain, Andreas Kulik and Stephanie Grond. 2016. Rare *Actinobacteria Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as Endophytes, Their Bioactivity and Metabolites Evaluation. *Elsevier journal*. Vol.185.
- Rafiah Mahmudah, Maswati Baharuddin dan Sappewali. 2016. Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Jurnal Kimia*. 4(1).

- Ramlah, Harli A. Karim, Sari Rahayu Rahman, Amir M dan Marcia Bunga Pabendon. 2022. Metode Ekstraksi Pada Plasma Nutfah Jewawut Sulawesi Barat Indonesia Menggunakan Buffer CTAB (*Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide*). *Jurnal Ilmu Pertanian*. 7(2): 149.
- Riahi, Hanieh Sadat., Parvin Heidarieh., Mehdi Fatahi Bafghi. 2021. Genus *Pseudonocardia*: What we know about its biological properties, abilities and current application in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 132(2): 890-906.
- Sabrina Wulandari dan Nanik Sulistyani. 2021. Pengaruh Media Terhadap Pertumbuhan Isolat *Actinobacteria* kode AL35 Serta Optimasi Produksi Metabolit Antibakteri Berdasarkan Waktu Fermentasi dan pH. *Jurnal Farmasi*. 13(2): 186-198.
- Sae W. Park, Sang T Park, Jung E Lee and Young M. Kim. 2008. *Pseudonocardia carboxydivorans* sp. nov., a carbon monoxide-oxidizing actinomycete and an emended description of the genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol(58): 2477.
- Sae W. Park, Sang T. Park, Jung E. Lee and Young M. Kim. 2008. *Pseudonocardia carboxydivorans* sp. nov., a carbon monoxide-oxidizing actinomycete and an emended description of the genus *Pseudonocardia*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol (58). ISSN: 2475-2478.
- Saidul Abrar, Khusi Muhammad, Hasnain Zaman, Suleman Khan, Faisal Nuroz and Nusheen bibi. 2017. Molecular genetic analysis of Type II Diabetes associated m.3243A>G Mitochondria DNA Mutation in a Pakistan Family. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 18(3): 305-308.
- Sambrook, J., and Rusell, D. W. 2011. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Third Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F., Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor. Page 87.
- Sambrook, J., Frirsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press. University of Texas South Western Medical Centre: Texas. Page: 47.
- Setia, Imanda Nurul dan Suharjono. 2015. Diversitas dan Uji Potensi Bakteri Kinolitik dari Limbah Udang. *Jurnal Biotropika*. 3(2): 96
- Shanti R, Pamella A, Fahrurrozi, Puspita L dan Wien K. 2016. Aktivitas Antibakteri Aktinomisetes Laut dari Pulau Enggano. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 15(3): 277.

- Shearer, T.L. & M.A. Coffroth. 2008. Barcoding Corals: Limited by Interspecific Divergence, not Intraspecific Variation. *Molecular Ecology Resources*. 8:247-255.
- Siti Juariah dan Riska Tiana. 2021. Media Alternatif Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Dari Biji Durian (*Durio zibethinus murr*). *Jurnal Poltekkes*. 9(1): 19-25.
- Sofariyanti AE, Sasongkowati R, Anggraini AD. 2019. Aktivitas Antibakteri Aktinomiset di Hutan Mangrove Wonorejo Surabaya yang Antagonis Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Anal Kesehatan Sains*. 8(2): 738-748.
- Sulistiyan, T. R., & Widhyastuti, N. 2011. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Molekuler Aktinomisetes Penghasil Antibiotik. *Jurnal Widyaset*, XIV (3), 541-548.
- Sun, Lei. Rapid detection of Down's syndrome using quantitative real-time PCR (qPCR) targeting segmental duplications on chromosomes 21 and 11. *Journal Gene* 552.2 : 272-276.
- Susilowati, Dwi N., Ratih D. Hastuti dan Erny Yuniarti. 2007. Isolasi dan Karakteristik Aktinomisetes Penghasil Antibakteri Enteropatogen *Escherichia coli* K1.1, *Pseudonocardia pseudomallei* 02 05, dan *Listeria monocytogenes* 5407. *Jurnal Agrobiogen*. 3(1): 15-23.
- Syah, Muhamad Azwar. 2022. Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Gen 16s rNA Bakteri Lipolitik asal Limbah Kulit Biji Jambu Mete. *Jurnal Sumberdaya Hayati*. 8(1): 24.
- Tan, S. C. And B.C. Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol.1. Pages: 1-10.
- Thermo Fisher Scientific. 2012. *NanoDrop Lite User Guide*. Thermo Fisher Scientific.
- Tristia Rinanda. 2011. Analisis Sekuensing 16s rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 11(3): 172-177.
- Whitman, W.B. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 5. New york, NY: Springer.
- Widiastoety D. Dan S. Kartikaningrum. 2003. Pemanfaatan Ekstrak Ragi Dalam Kultur *In Vitro* Planlet Media Anggrek. *Jurnal Hortikultura*. 13(2): 82-86.
- Akihary, C. V., Beivy, J. K. 2020. Pemanfaatan Gen 16s rRNA Sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian Di Indonesia. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 9(1): 16-22.

- Yanti Ariyanti, Sister Sianturi. 2019. Ekstraksi DNA Total dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode Kit for Animal Tissue). *Jurnal of Science and Applicative Technology*. 3(1) : 40-45.
- Ramesh, C., Tulasi, B. R., Raju, M., Thakur, N., & Dufosse, L. 2021. Marine Natural Products from Tunicates and Their Associated Microbes. *Journal Marine Drugs*. 19(6).
- Ali Aj dan Tamiselvi, M. 2016. *Ascidian in Coastal Water*. Switzerland : Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-31929118-5.