

**OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DNA GENOM BAKTERI
SEDERHANA SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN METODE
AUTENTIKASI STOK KULTUR BAKTERI
MENGUNAKAN RAPD**



**ANNISA MUTHMAINNAH
NIM. 22032008/2022**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2026**

**OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DNA GENOM BAKTERI
SEDERHANA SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN METODE
AUTENTIKASI STOK KULTUR BAKTERI
MENGUNAKAN RAPD**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar
Sarjana Sains*



**Oleh:
ANNISA MUTHMAINNAH
NIM. 22032008/2022**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2026**

PERSETUJUAN SKRIPSI

OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DNA GENOM SEDERHANA SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN KIT AUTENTIKASI STOK KULTUR BAKTERI MENGGUNAKAN METODE RAPD

Nama : Annisa Muthimainnah
NIM : 22032008
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

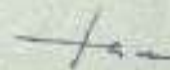
Padang, 19 April 2026

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi

Disetujui Oleh
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M. Biomed
NIP. 197508152006042001



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M. Biomed
NIP. 197508152006042001

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Annisa Muthenainnah
NIM : 22032008
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DNA GENOM SEDERHANA SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN KIT AUTENTIKASI STOK KULTUR BAKTERI MENGGUNAKAN METODE RAPD

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Departemen
Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri
Padang

Padang, 29 April 2026

Tim Penguji

- | | Nama |
|------------|--------------------------------------|
| 1. Ketua | Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M. Biomed |
| 2. Anggota | Prof. Dr. Yuni Ahda, S.Si, M.Si |
| 3. Anggota | Dr. Irdawati, M.Si |

Tanda Tangan



SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

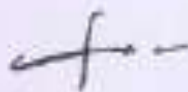
Nama : Annisa Muthmainnah
NIM : 22032008
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "Optimasi Teknik Isolasi Dna Genom Sederhana Sebagai Dasar Pengembangan Kit Autentikasi Stok Kultur Bakteri Menggunakan Metode RAPD" adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 22 Maret 2026

Mengetahui
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M. Biomed.
NIP. 197508152006042001

Saya yang menyatakan,



Annisa Muthmainnah
NIM. 22032008

OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DNA GENOM SEDERHANA SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN METODE AUTENTIKASI STOK KULTUR BAKTERI MENGUNAKAN RAPD

Annisa Muthmainnah

ABSTRAK

Isolasi DNA genom bakteri merupakan tahapan penting dalam analisis molekuler, termasuk autentikasi stok kultur bakteri. Metode isolasi DNA yang umum digunakan sering kali memerlukan biaya tinggi dan prosedur yang kompleks. Oleh karena itu, diperlukan metode alternatif yang lebih sederhana dan ekonomis namun tetap fungsional. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi metode isolasi DNA genom bakteri berbasis *boiling* serta mengevaluasi sensitivitas dan aplikasinya sebagai sumber DNA cetakan untuk analisis PCR dan PCR-RAPD pada beberapa isolat bakteri.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, dilakukan di Laboratorium Biologi menggunakan beberapa stok kultur bakteri dengan karakteristik suhu optimum berbeda. Optimasi dilakukan terhadap variasi suhu dan waktu *boiling*, konsentrasi *buffer* TE (1 dan 1/10), serta stabilitas DNA melalui uji *freeze-thawing*. Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur menggunakan nanofotometer, kemudian kelayakan DNA sebagai cetakan diuji melalui PCR konvensional menggunakan primer 16S rRNA dan PCR-RAPD menggunakan primer OPA-02, OPA-04, dan OPE-15. Sensitivitas metode dianalisis berdasarkan pengenceran kultur bakteri mengacu pada standar McFarland.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode *boiling* dengan kondisi optimum mampu menghasilkan DNA genom dengan kualitas yang cukup baik dan dapat diamplifikasi melalui PCR dan PCR-RAPD. Buffer TE (1) memberikan stabilitas DNA yang lebih baik, dan metode ini tetap efektif meskipun kemurnian DNA tidak selalu mencapai standar ideal. Secara keseluruhan, metode yang dioptimasi bersifat sederhana, cepat, dan aplikatif, sehingga berpotensi digunakan sebagai dasar pengembangan metode autentikasi stok kultur bakteri di laboratorium dengan keterbatasan sumber daya.

Kata kunci: *Bakteri, Isolasi DNA, Metode boiling, PCR, RAPD*

OPTIMIZATION OF SIMPLE GENOME DNA ISOLATION TECHNIQUES AS THE BASIS FOR DEVELOPING A METHOD FOR AUTHENTICATING BACTERIAL CULTURE STOCKS USING RAPD

Annisa Muthmainnah

ABSTRACT

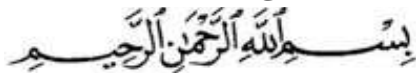
Isolation of bacterial genomic DNA is a crucial step in molecular analysis, including the authentication of bacterial stock cultures. Commonly used DNA isolation methods are often expensive and require complex procedures. Therefore, simpler, more economical, and functional alternative methods are needed. This study aimed to optimize a boiling-based bacterial genomic DNA isolation method and evaluate its sensitivity and application as a source of template DNA for PCR and PCR-RAPD analysis on several bacterial isolates.

This descriptive study was conducted in the Biology Laboratory using several bacterial stock cultures with different optimum temperature characteristics. Optimization was performed on variations in boiling temperature and time, TE buffer concentration (1 and 1/10), and DNA stability through a freeze-thaw assay. DNA concentration and purity were measured using a nanophotometer, and the DNA's suitability as a template was tested using conventional PCR using 16S rRNA primers and PCR-RAPD using primers OPA-02, OPA-04, and OPE-15. Method sensitivity was analyzed based on bacterial culture dilutions based on McFarland standards.

The results showed that the boiling method, under optimum conditions, produced genomic DNA that was sufficiently pure and amplified successfully using both conventional PCR and PCR-RAPD. The use of TE (1) buffer provided a balance between DNA stability and compatibility with PCR reactions. The optimized method is simple, rapid, and applicable for authenticating various bacterial culture stocks in the laboratory.

Keywords: DNA isolation, Boiling method, PCR, RAPD, Bacteria

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“Optimasi Teknik Isolasi DNA Genom Sederhana Sebagai Dasar Pengembangan Metode Autentikasi Stok Kultur Bakteri Menggunakan Metode RAPD”**. Shalawat beriring salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW Rasul junjungan seluruh alam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed. selaku Kepala Departemen Biologi dan juga sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan nasihat, waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan dalam pelaksanaan penelitian penulis hingga menyelesaikan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Prof. Dr. Yuni Ahda M.Si dan Ibu Dr. Irdawati S.Si., M.Si sebagai penguji yang telah memberikan kritikan dan saran dalam penulisan skripsi ini.
3. Bapak Rijal Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat, bimbingan dan motivasi selama penulis belajar dan beraktivitas di Departemen Biologi.
4. Bapak/Ibu dosen dan tenaga kependidikan di lingkungan Departemen Biologi FMIPA UNP yang telah membantu penulis berproses dan belajar selama menjalani perkuliahan hingga pelaksanaan penelitian.
5. Ibu, Abang, Kakak, dan adik serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, dukungan, dan bantuan selama penulis berproses dan belajar di Departemen Biologi FMIPA UNP.
6. Dila, sahabat penulis sebagai pendengar yang baik, selalu menerima keluhan penulis dan menemani masa masa sulit penulis terkait perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi.
7. Sahabat perkuliahan penulis: Nabila, Hazel, Kia, Thata, Huria, Delon, Melan,

Desrinda, Intan, zahra dan kelas sains C angkatan 22 terimakasih untuk semua dukungan dan motivasi yang penulis dapatkan selama menjadi mahasiswa.

8. Tim penelitian; Lail, Palup, Eka dan Astrid yang telah membantu penulis dan menemani penulis dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi.
9. Kak Liza dan kak Tesya yang senantiasa membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan skripsi.
10. Keluarga besar Koloni Biologi 2022 yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
11. Semua pihak yang terlibat, ikut berpartisipasi serta memberikan bantuan selama proses pembelajaran penulis hingga penyelesaian skripsi.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan bernilai ibadah dan mendapatkan balasan yang setimpal dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi orang yang membacanya.

Padang, Maret 2026

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian.....	8
D . Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A . Struktur Dinding Sel Bakteri.....	9
B. Ekstraksi DNA Metode <i>Boiling</i>	12
C . Teknik RAPD	14
BAB III METODE PENELITIAN	17
A . Jenis Penelitian.....	17
B. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
C . Alat dan Bahan.....	17
D. Prosedur Penelitian.....	18
E. Analisis Data.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
A . Hasil Penelitian.....	26
B . Pembahasan.....	35
BAB V	35
PENUTUP	46
A . Kesimpulan	46
B . Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Stok kultur bakteri.....	18
2. Primer 16S rRNA.....	18
3. Primer PCR RAPD	18
4. Variasi suhu dan waktu.....	20
5. Komponen reaksiPCR RAPD	21
6. Standar Mc-Farland 0,5-10	23
7. Komponen reaksiPCR 16S rRNA.....	24
8. Komponen reaksi PCR RAPD OPA 02, OPA 04, dan OPE 15.....	25
9. Hasil Isolasi DNA Optimasi Suhu dan Waktu.....	26
10. Hasil Isolasi DNA Optimasi Kosentrasi TE	27
11. Hasil Isolasi DNA Optimasi Sensitifitas Bakteri.....	31
12. Hasil validasi metode optimum isolasi bakteri	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perbandingan Struktur Sel Bakteri.....	10
2. Perbedaan Struktur Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif	11
3. Hasil Elektroforesis Suhu dan Waktu	26
4. Hasil elektroforesis optimasi konsentrasi TE.....	28
5. Stabilitas DNA Bakteri	29
6. Hasil elektroforesis freeze thawing.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Isolasi Kosentrasi TE.....	52
2. Hasil Isolasi <i>freeze-thawing</i> 1	52
3. Hasil Isolasi <i>freeze-thawing</i> 2	52
4. Hasil Isolasi <i>freeze-thawing</i> 2	52
5. Hasil isolasi Kerapatan Bakteri.....	52
6. Hasil Isolasi Validasi Metode Optimum <i>Boiling</i>	53
7. Ciri-ciri spesifik isolat bakteri.....	53

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pengembangan produk berbasis bakteri dalam bidang bioteknologi merupakan proses yang kompleks dan memerlukan pengelolaan kultur mikroorganisme yang baik. Salah satu aspek krusial dalam proses tersebut adalah penyediaan dan penyimpanan kultur stok bakteri yang berfungsi sebagai sumber utama untuk penelitian lanjutan, baik pada tahap optimasi maupun produksi. Penyimpanan bakteri umumnya dilakukan dalam bentuk kultur stok untuk menjamin keberlangsungan hidup serta stabilitas sifat strain. Namun demikian, kultur stok perlu diperbarui secara berkala melalui proses subkultur untuk menjaga viabilitas sel bakteri (Reflinaldon *et al.*, 2023).

Proses subkultur yang dilakukan secara berulang dalam jangka panjang dapat menimbulkan berbagai permasalahan serius. Peremajaan kultur yang terus-menerus berpotensi memicu terjadinya seleksi varian, yang pada akhirnya dapat menyebabkan perubahan sifat genetik maupun fenotipik bakteri. Molina-Torres (2010) melaporkan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* dengan frekuensi subkultur tinggi menunjukkan peningkatan laju mutasi yang berdampak pada perubahan virulensi. Selain itu, faktor teknis seperti kontaminasi silang maupun kesalahan pelabelan akibat *human error* dapat menyebabkan tertukarnya isolat atau bahkan hilangnya kultur stok (Machmud, 2001). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa autentikasi kultur stok bakteri menjadi langkah penting untuk memastikan identitas dan kemurnian isolat tetap terjaga serta meminimalkan dampak negatif akibat proses subkultur berulang.

Autentikasi kultur stok bertujuan untuk memastikan bahwa isolat yang disimpan tetap murni, bebas dari kontaminasi, dan sesuai dengan karakter aslinya. Autentikasi bakteri secara konvensional umumnya diawali dengan pengamatan morfologi koloni secara makroskopis maupun mikroskopis, serta dilanjutkan dengan uji biokimia berdasarkan karakter fisiologis, seperti uji MR-VP, fermentasi gula, SIM, TSIA, indol, dan Simmons citrate. Meskipun metode tersebut masih banyak digunakan, pendekatan konvensional memiliki keterbatasan, terutama dalam membedakan isolat yang memiliki karakter fisiologis serupa atau pada kondisi kultur yang telah mengalami perubahan sifat akibat subkultur berulang (Inayatul *et al.*, 2018).

Seiring berkembangnya biologi molekuler, metode identifikasi berbasis DNA mulai banyak digunakan karena dinilai lebih cepat, sensitif, dan spesifik. Berbagai teknik analisis molekuler seperti ISSR, RFLP, AFLP, SSR, maupun RAPD telah direkomendasikan untuk keperluan autentikasi kultur stok mikroorganisme (Garcia *et al.*, 2004). Salah satu teknik yang banyak digunakan adalah Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), yaitu teknik penanda molekuler berbasis PCR yang menggunakan primer sintetis pendek untuk mengamplifikasi DNA secara acak. Teknik RAPD relatif murah, mudah diaplikasikan, cepat, serta mampu menghasilkan pola pita DNA polimorfik tanpa memerlukan informasi urutan basa spesifik (Dewi *et al.*, 2023). RAPD telah dimanfaatkan dalam berbagai penelitian mikroorganisme, antara lain untuk pengelompokan bakteri pada susu sapi mastitis, identifikasi *Escherichia coli* dalam industri es krim, serta karakterisasi *Burkholderia cepacia* penyebab fibrosis kistik (Furlanis *et al.*, 2010; Luche *et al.*, 2017; Mustopa *et al.*, 2018).

Pengembangan teknik RAPD memiliki tantangan tersendiri, terutama terkait konsistensi dan reproduktibilitas hasil. Ketidakstabilan hasil RAPD sering disebabkan oleh primer yang tidak menempel secara optimal pada cetakan DNA, sehingga menghasilkan pita DNA yang samar atau bervariasi antar ulangan (Pratiwi, 2023). Oleh karena itu, keberhasilan analisis RAPD sangat bergantung pada kualitas DNA genom yang digunakan sebagai templat, baik dari segi kemurnian maupun konsentrasinya. Untuk itu isolasi DNA genom merupakan tahap kunci yang menentukan keberhasilan dan kestabilan profil RAPD.

Isolasi DNA genom berkualitas tinggi merupakan tahap krusial dalam analisis molekuler, termasuk PCR, sekuensing, dan kajian keragaman genetik. Keberhasilan isolasi DNA ditentukan oleh kemurnian dan konsentrasi DNA yang memadai. Kemurnian DNA umumnya ditandai oleh rasio absorbansi A260/280 sebesar 1,8–2,0 serta rasio A260/230 sebesar 2,0–2,2. Nilai di luar rentang tersebut mengindikasikan adanya kontaminasi protein, sisa *buffer*, atau RNA yang berpotensi menghambat reaksi PCR (Tanzil & Fanata, 2024). Selain itu, konsentrasi DNA templat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi, di mana penelitian Probojati (2019) menggunakan konsentrasi DNA berkisar antara 5–25 ng/μL pada reaksi PCR RAPD. Namun pada penelitian Fihiruddin,(2022) dan Taufiqulhakim *et al*, (2025) mengidentifikasi bakteri menggunakan metode boiling menjelaskan umumnya kemurnian DNA memiliki kemurnian DNA yang cukup rendah atau tidak mencapai standar rasio kemurnian A260/280 namun pada hasil visualisasi metode boiling menggunakan PCR konvensional menghasilkan pita DNA yang sama pada metode KIT.

Berbagai metode isolasi DNA telah dikembangkan, mulai dari penggunaan kit komersial hingga teknologi berbasis robotik (Boesenberg-Smith *et al.*, 2012). Menurut (Becker *et al.*, 2016), kit isolasi DNA umumnya mampu menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian dan reproduktibilitas yang tinggi, namun penggunaan kit memiliki keterbatasan, terutama dari segi biaya yang relatif mahal serta komposisi reagen yang bersifat *proprietary*. Hal ini tidak memungkinkan untuk modifikasi protokol sesuai kebutuhan spesifik sampel (Ramírez *et al.*, 2018).

Keterbatasan penggunaan kit isolasi DNA komersial mendorong perlunya pendekatan alternatif yang lebih fleksibel dan mudah diaplikasikan. Dalam konteks autentikasi stok kultur bakteri yang bersifat rutin dan berulang, metode isolasi DNA tidak hanya dituntut menghasilkan DNA dengan kemurnian tinggi, tetapi juga harus efisien, konsisten, dan dapat diterapkan secara luas di berbagai kondisi laboratorium. Oleh karena itu, metode isolasi DNA genom yang sederhana menjadi pilihan strategis yang perlu dikaji dan dioptimasi lebih lanjut.

Metode isolasi DNA genom sederhana memiliki sejumlah keunggulan dalam mendukung autentikasi stok kultur bakteri, terutama untuk penggunaan rutin. Metode ini umumnya melibatkan tahapan kerja yang lebih singkat, penggunaan reagen yang minimal, serta waktu pengerjaan yang relatif cepat, sehingga lebih efisien dan mengurangi potensi kesalahan teknis maupun kontaminasi silang (Boesenberg-Smith *et al.*, 2012; Schrader *et al.*, 2012). Selain itu, metode sederhana lebih mudah distandarisasi dan direproduksi, sehingga sangat mendukung kebutuhan autentikasi stok kultur yang menuntut konsistensi hasil (Becker *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2004). Keunggulan tersebut menjadikan

isolasi DNA sederhana sebagai komponen kunci dalam pengembangan KIT autentikasi stok kultur bakteri yang aplikatif, ekonomis, dan mudah digunakan.

Salah satu metode isolasi DNA sederhana yang banyak digunakan adalah teknik *boiling*. Teknik ini memanfaatkan pemanasan suhu tinggi untuk melisiskan dinding dan membran sel bakteri sehingga DNA dilepaskan ke dalam larutan (Murray *et al.*, 2022). Meskipun praktis dan ekonomis, teknik *boiling* memiliki sejumlah kelemahan, antara lain potensi fragmentasi DNA akibat pemanasan tinggi, ko-ekstraksi senyawa pengotor yang berperan sebagai inhibitor PCR, serta efisiensi lisis sel yang rendah terutama pada bakteri Gram positif dengan dinding sel tebal (Boza *et al.*, 2024; Dimitrakopoulou *et al.*, 2020; Schrader *et al.*, 2012).

Suhu dan waktu pada metode *boiling* merupakan langkah krusial dalam isolasi DNA bakteri karena berpengaruh langsung terhadap efektivitas lisis sel dan mutu DNA yang dihasilkan sebagai cetakan PCR. Perlakuan pemanasan berfungsi merusak dinding dan membran sel bakteri agar DNA dapat dilepaskan, namun suhu dan durasi yang kurang tepat dapat menyebabkan lisis yang tidak maksimal atau justru mengakibatkan degradasi DNA (Fihiruddin *et al.*, 2022). Selain itu, perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif turut memengaruhi kebutuhan perlakuan *boiling*, di mana bakteri Gram positif dengan lapisan peptidoglikan yang tebal umumnya memerlukan pemanasan yang lebih optimal atau perlakuan tambahan, sedangkan bakteri Gram negatif dengan peptidoglikan tipis dan membran luar lebih sensitif terhadap pemanasan (Beveridge, 2001). Oleh karena itu, optimasi suhu dan waktu *boiling* perlu dilakukan secara spesifik.

Faktor lain yang memengaruhi kualitas DNA hasil isolasi adalah

penggunaan *buffer* elusi, seperti *buffer* TE, yang berfungsi melindungi DNA dari degradasi oleh enzim nuklease. Namun, keberadaan EDTA dalam *buffer* TE dapat menghambat reaksi enzimatik, termasuk PCR, apabila digunakan dalam konsentrasi yang tidak tepat. Oleh karena itu, optimasi konsentrasi *buffer* TE serta pengenceran suspensi sel bakteri menjadi faktor penting untuk menghasilkan DNA dengan kualitas yang optimal (Leigh *et al.*, 2019; Sundari & Priadi, 2020; Tanzil & Fanata, 2024).

Konsentrasi *buffer* TE perlu diuji terhadap kestabilan DNA karena keberhasilan isolasi DNA genom dengan metode *boiling* tidak hanya ditentukan oleh proses lisis, tetapi juga oleh stabilitas DNA selama penyimpanan. DNA yang telah diisolasi sering mengalami siklus pembekuan dan pencairan sebelum digunakan pada PCR atau analisis lanjutan. Penelitian menunjukkan bahwa siklus *freeze-thawing* berulang dapat menyebabkan degradasi DNA genom, terutama pada fragmen berukuran besar, sehingga ukuran DNA menurun dan kualitasnya sebagai template PCR berkurang (Shao *et al.*, 2012). Oleh karena itu, pengujian konsentrasi *buffer* TE serta pengelolaan penyimpanan DNA, termasuk meminimalkan siklus *freeze-thawing*, menjadi penting untuk menjaga integritas DNA agar tetap layak digunakan pada analisis molekuler seperti PCR RAPD.

Kajian yang mengoptimasi parameter-parameter kunci pada metode isolasi DNA berbasis *boiling*, meliputi suhu dan waktu *boiling*, konsentrasi *buffer* TE, stabilitas DNA dalam *buffer* TE, serta pengenceran suspensi sel bakteri secara simultan untuk mendukung analisis RAPD sebagai metode autentikasi kultur stok bakteri masih terbatas. Padahal, optimasi parameter-parameter tersebut berpotensi menghasilkan metode isolasi DNA yang sederhana, ekonomis, namun tetap

mampu menghasilkan DNA dengan kualitas dan kestabilan yang memadai untuk analisis RAPD yang konsisten dan reproduktif.

Berdasarkan permasalahan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi teknik isolasi DNA genom bakteri berbasis metode *boiling* melalui suhu dan waktu *boiling*, konsentrasi *buffer* TE, dan stabilitas DNA dalam *buffer* TE bakteri serta pengenceran suspensi sel bakteri. Hasil optimasi diharapkan dapat meningkatkan kemurnian dan kestabilan DNA sehingga menghasilkan profil RAPD yang lebih konsisten dan reproduktif. Pendekatan ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan KIT autentikasi stok kultur bakteri yang aplikatif, ekonomis, dan mudah diterapkan, khususnya bagi laboratorium dengan keterbatasan fasilitas.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini disusun dengan judul Optimasi Teknik Isolasi DNA Genom Bakteri Sederhana sebagai Dasar Pengembangan Metode Autentikasi Stok Kultur Bakteri Menggunakan RAPD.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana Kondisi optimum isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *boiling* ?
2. Bagaimana sensitifitas teknik isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *boiling* ?
3. Apakah teknik isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *boiling* dapat digunakan untuk mengisolasi DNA cetakan dalam reaksi RAPD dari berbagai jenis bakteri?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mendapatkan kondisi optimum metode *boiling* untuk isolasi DNA genom bakteri.
2. Untuk mengetahui sensitifitas teknik isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *boiling*.
3. Untuk mengetahui apakah teknik isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *boiling* dapat digunakan untuk mengisolasi DNA cetakan dalam reaksi RAPD dari berbagai jenis bakteri

D . Manfaat Penelitian

Manfaat Penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai metode isolasi DNA genom bakteri secara sederhana.
2. Mendapatkan DNA dengan kualitas baik yang dapat digunakan sebagai cetakan pada teknik RAPD.
3. Membantu Penelitian di laboratorium dengan sumber daya yang terbatas.
4. Menjadi acuan pengembangan metode isolasi DNA genom dalam bidang Bioteknologi dan Molekuler.

BAB V

PENUTUP

A . Kesimpulan

1. Kondisi optimum isolasi DNA genom bakteri diperoleh pada suhu 90°C selama 10 menit dengan penggunaan buffer TE (1), karena menghasilkan pita DNA yang paling jelas, pada elektroforesis serta menunjukkan stabilitas DNA yang lebih baik selama penyimpanan.
2. Metode *boiling* sensitif terhadap kerapatan sel bakteri, di mana peningkatan nilai OD meningkatkan konsentrasi DNA. Kondisi optimum diperoleh pada OD 6 karena memberikan keseimbangan antara konsentrasi DNA dan kemurnian, serta pita DNA yang optimal.
3. Dengan demikian, metode *boiling* tetap layak digunakan sebagai metode isolasi DNA yang sederhana, cepat, dan ekonomis untuk autentikasi bakteri, namun perlu mempertimbangkan jenis bakteri, kondisi isolasi, serta kecocokan primer agar diperoleh hasil yang optimal dan konsisten.

B . Saran

1. Untuk bakteri Gram positif, disarankan menambahkan perlakuan lisis seperti enzim (lisozim/lysostaphin) agar isolasi DNA lebih optimal.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan kombinasi metode pemurnian sederhana untuk meningkatkan kualitas DNA tanpa mengurangi efisiensi metode *boiling*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abusleme, L., Hong, B. Y., Dupuy, A. K., Strausbaugh, L. D., & Diaz, P. I. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.3402/jom.v6.23990>
- Ahmed, O. B., & Dablood, A. S. (2017). Quality Improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. *International Journal of Bioassays*, 6(04), 5347. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.04.004>
- Ao, M., Ae, A., & De, T. (2020). *Department of Biological Sciences (Microbiology Unit), School of Basic and Applied Sciences , Elizade*. 47–52.
- Becker, L., Steglich, M., Fuchs, S., Werner, G., & Nübel, U. (2016). Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for MiSeq sequencing. *Scientific Reports*, 6(May), 10–14. <https://doi.org/10.1038/srep28063>
- Benčič, A., Toplak, N., Koren, S., Košir, A. B., Milavec, M., Tomič, V., Lužnik, D., Dreo, T., Benčič, A., Toplak, N., Koren, S., Košir, A. B., Milavec, M., Tomič, V., Lužnik, D., & Dreo, T. (2024). *Bacterial Microbiome and Resistome in Sputum*. 9(9), 1–16.
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Boesenberg-Smith, K. A., Pessarakli, M. M., & Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>
- Boza, J. M., Manning, J. C., & Erickson, D. C. (2024). Comparison and Optimization of Simple DNA Extraction Methods for LAMP-Based Point-of-Care Applications Employing Submillimeter Skin Biopsies. *ACS Omega*, 9(37), 38855–38863. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05025>
- Bruner, E. A., Okubara, P. A., Abi-Ghanem, R., Brown, D. J., & Reardon, C. L. (2015). Use of pressure cycling technology for cell lysis and recovery of bacterial and fungal communities from soil. *BioTechniques*, 58(4), 171–180. <https://doi.org/10.2144/000114273>
- Dewi, N. A. H., Pancaningtyas, S., & Su'udi, M. (2023). Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) genetic uniformity through RAPD molecular markers. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 39(3), 173–183. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v39i3.566>
- Dimitrakopoulou, M.-E., Stavrou, V., Kotsalou, C., & Vantarakis, A. (2020). Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 03(04), 311–319. <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000057>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005).

- Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Febrianti, L. (2025). *Analisis Profil Genetik Bakteri Endofit Andalas (Morus Macroura Miq.) Penghasil Senyawa Antimikroba Menggunakan Metode Sekuensing Dan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*.
- Fihiruddin, F., Ilmi, H. F., & Khusuma, A. (2022). Variasi Temperatur Boiling pada Amplifikasi Gen inhA M.tuberculosis Metode PCR. *Titian Ilmu: Jurnal Ilmiah Multi Sciences*, 14(2), 57–62. <https://doi.org/10.30599/jti.v14i2.1661>
- Furlanis, L., Corich, L., Dolzani, L., Tonin, E. A., & Lagatolla, C. (2010). Characterization of integrons in Burkholderia cepacia clinical isolates. *Microbiologia Medica*, 25(1), 41–44. <https://doi.org/10.4081/mm.2010.2483>
- Garcia, A. A. F., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M. M., Geraldini, I. O., Souza, C. L., & de Souza, A. P. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27(4), 579–588. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000400019>
- 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.
- Inayatul, W. O., Muchlissin, S. I., Mukaromah, H. A., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2018). Isolasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Protease Pseudomonas Stutzeri Istd4 Dari Tempe Gembus Pasca Fermentasi 1 Har. *Seminar Nasional Edusaintek, October*, 102–109.
- Leigh, G. K., Sinha, R., & Vogtmann, E. (2019). DNA extraction for human microbiome studies: The issue of standardization. *Genome Biology*, 20(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1843-8>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–14. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Luche, D. E. D., Andrade, A. P., Cervellati, E. P., & Matos, D. J. (2017). Aspecto Higiénico-Sanitário De Sorvetes Artesanais E Industriais: Análise Da Variabilidade Genética E Da Resistência a Antimicrobianos Em Escherichia Coli Isoladas. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 12(2). <https://doi.org/10.12957/demetra.2017.26754>
- Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1), 24–32.
- Madigan, M. T., K. S., B., Buckley, D. H., M. Sattley, W., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (Pearson).
- Mahesh, P. P., Kolape, J., Sultana, H., & Neelakanta, G. (2025). McFarland Standards-Based Spectrophotometry Method for Calculating Approximate Multiplicity of Infection for an Obligate Intracellular Bacterium Anaplasma phagocytophilum. *Microorganisms*, 13(3).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms13030662>

- Molina-Torres, C. A., Castro-Garza, J., Ocampo-Candiani, J., Monot, M., Cole, S. T., & Vera-Cabrera, L. (2010). *Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of Mycobacterium tuberculosis* (Vol. 59, Issue Pt 4, pp. 384–391). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015966-0>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mustopa, A. Z., Puspitasari, I. F., Fatimah, Triratna, L., & Kartina, G. (2018). Genetic diversity of mastitis cow's milk bacteria based on RAPD-PCR. *Biodiversitas*, 19(5), 1714–1721. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190517>
- Parzygnat, J. L., Crespo, R., Koci, M. D., Dunn, R. R., Harden, L., Fosnaught, M., & Thakur, S. (2024). Widespread prevalence of plasmid-mediated blaCTX-M type extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* in backyard broiler production systems in the United States. *PLoS ONE*, 19(6 June), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304599>
- Pratiwi, N. (2023). Profil RAPD Kultur Stok Bakteri Endofit ANDALAS (*Morus macroura* Miq.) Penghasil Senyawa Antimikroba. *Accident Analysis and Prevention*, 183(2), 153–164.
- Probojati, R. T., Wahyudi, D., & Hapsari, L. (2019). *Clustering Analysis and Genome Inference of Pisang Raja Local Cultivars (Musa spp .) from Java Island by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker*. 04(02). <https://doi.org/10.22146/jtbb.44047>
- Ramírez, G. A., Graham, D., & D'Hondt, S. (2018). Influence of commercial DNA extraction kit choice on prokaryotic community metrics in marine sediment. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(9), 525–536. <https://doi.org/10.1002/lom3.10264>
- Reflinaldon, Habazar, T., Yanti, Y., Hamid, H., & Miranti. (2023). Whitefly, *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) Control using a Solid Formulation of Selected Endophytic Bacteria, *Bacillus pseudomycoides* Strain SLBE 1.1SN. *Agrivita*, 45(3), 523–530. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v45i3.4033>
- Rosmania, & Yanti, F. (2020). Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 76–86.
- Ross, K. S., Haites, N. E., & Kelly, K. F. (1990). Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J. Med Genet*, 27, 569–570.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johnne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Shao, W., Khin, S., & Kopp, W. C. (2012). Characterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *BIOPRESERVATION AND BIOBANKING*, 10(1), 4–11. <https://doi.org/10.1089/bio.2011.0016>
- Shehata, A., & Hershan, A. (2016). Boiling, Freezing - Thawing and Simple Chemical Extraction Methods Are Comparable to Costly Kit - Based Bacterial DNA Extraction Methods as Evidenced by Conventional and Real-Time PCR. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 25(1), 45–51. <https://doi.org/10.12816/0037091>
- Sirwati, F., Nurfalinda, S., Atika Salsabila, S., & Hilda Putri, D. (2024). Comparison of Boiling Methods for Bacterial DNA Isolation Using Waterbath and Heatblock Perbandingan Metode Boiling untuk Isolasi DNA Bakteri Menggunakan Waterbath dan Heatblock. *Serambi Biologi*, 9(1), 115–118.
- Stojan, I., Trumbić, Ž., Lepen Pleić, I., & Šantić, D. (2023). Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in metabarcoding of mock and marine bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 14(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151907>
- Sundari, S., & Priadi, B. (2020). Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 87–90.
- Tanzil, A. I., & Fanata, W. I. D. (2024). Pengaruh Teknik Isolasi Dna Genom Tanaman Tembakau Terhadap Kualitas Dan Kuantitas Hasil Ekstraksi. *AGRORADIX: Jurnal Ilmu Pertanian*, 7(2), 21–28. <https://doi.org/10.52166/agroteknologi.v7i2.6215>
- Taufiqulhakim, M. R., Linosefa, Syahrul, M. Z., & Putra, A. E. (2025). Perbandingan Metode Boiling Dan Kit Komersial Untuk Ekstraksi DNA TB, Tinjauan Dari Aspek Kualitas, Kuantitas, Dan Integritas DNA. *Indonesian Journal of Health Science*, 6(4), 325–331.
- Weishaupt, H., & Attema, J. L. (2010). A Method to Study the Epigenetic Chromatin States of Rare Hematopoietic Stem and Progenitor Cells; MiniChIP–Chip. *Biol Proced*, 12, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12575-010-9031-y>
- Wilfinger, W. W., & Chomczynski, K. M. P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474–476, 478–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- Wilson, I. A. N. G. (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,

63(10), 3741–3751.

- Wulandari, T. (2024). *POLA RESISTENSI ANTIBIOTIK ESCHERICHIA COLI PENGHASIL EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES (ESBL) YANG DIISOLASI DARI AIR LIMBAH PETERNAKAN AYAM DI KOTA PAYAKUMBUH SUMATERA BARAT PROPOSAL PENELITIAN OLEH: TESYA WULANDARI PROGRAM STUDI BIOLOGI.*
- Yang, J. L., Wang, M. S., Cheng, A. C., Pan, K. C., Li, C. F., & Deng, S. X. (2008). A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World Journal of Gastroenterology*, 14(18), 2872–2876. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2872>
- Zoetendal, E. G., Heilig, H. G. H. J., Klaassens, E. S., Boonjink, C. C. G. M., Kleerebezem, M., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2006). Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nature Protocols*, 1(2), 870–873. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.142>