

**PERBANDINGAN ISOLASI DNA BAKTERI *Escherichia coli*  
DENGAN METODE *HEAT TREATMENT* DAN *FILTER BASED*  
KIT BERDASARKAN NILAI *LIMIT OF DETECTION* DAN *LIMIT*  
*OF QUANTIFICATION***

**SKRIPSI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

**BRILLIAN NUR MUHAMMAD**

**21601101014**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS ISLAM MALANG**

**2020**



**PERBANDINGAN ISOLASI DNA BAKTERI *Escherichia coli*  
DENGAN METODE *HEAT TREATMENT* DAN *FILTER BASED*  
KIT BERDASARKAN NILAI *LIMIT OF DETECTION* DAN *LIMIT*  
*OF QUANTIFICATION***

**SKRIPSI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

**BRILLIAN NUR MUHAMMAD  
21601101014**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM MALANG  
2020**



**PERBANDINGAN ISOLASI DNA BAKTERI *Escherichia coli*  
DENGAN METODE *HEAT TREATMENT* DAN *FILTER BASED*  
KIT BERDASARKAN NILAI *LIMIT OF DETECTION* DAN *LIMIT*  
*OF QUANTIFICATION***

**SKRIPSI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

**BRILLIAN NUR MUHAMMAD**

**21601101014**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS ISLAM MALANG**

**2020**

## Perbandingan Isolasi DNA Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode *Heat Treatment* dan *Filter Based Kit* Berdasarkan Nilai *Limit of Detection* dan *Limit of Quantification*

Brilliant Nur Muhammad, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Salah satu metode isolasi DNA yang sederhana dan cepat adalah dengan metode pemanasan (*heat treatment*). Namun belum diketahui apakah metode tersebut memiliki hasil yang sama baiknya seperti metode *filter based kit* yang sudah umum digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan metode isolasi DNA antara *heat treatment* dengan *filter based kit* yang didasarkan pada *limit of detection (LOD)* dan *limit of quantification (LOQ)* yang didapat dari perhitungan *yield* pada bakteri *E. coli*.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Konsentrasi bakteri *E. coli* digunakan sebagai sampel diambil menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu pada konsentrasi  $10^1 - 10^4$  CFU/ml. Metode *heat treatment* dan metode *filter based kit* adalah metode isolasi DNA yang diuji dalam penelitian ini. Analisa data menggunakan uji ANOVA dan dilakukan uji *Least Significant Difference (LSD)*.

**Hasil:** *Yield heat treatment* berbeda dengan kontrol pada konsentrasi 10.000 CFU/ml ( $p=0.000$ ), dan 1000 CFU/ml ( $p=0.002$ ). Sedangkan pada *filter based kit* konsentrasi 10.000 CFU/ml ( $p=0.003$ ), 1000 CFU/ml ( $p=0.009$ ) dan 100 CFU/ml ( $p=0.033$ ). Nilai kemurnian pada metode *heat treatment* dan *filter based kit* tidak ada yang mencapai angka 1,7-2,0. *LOD heat treatment* adalah 2,39 ng/ $\mu$ l, sedangkan *filter based kit* adalah 4,06 ng/ $\mu$ l. *LOQ heat treatment* adalah 6, 43 ng/ $\mu$ l, sedangkan *filter based kit* adalah 8, 10 ng/ $\mu$ l.

**Kesimpulan:** Berdasarkan *limit of detection*, metode *heat treatment* memiliki konsentrasi bakteri minimum 1000 CFU/ml. Sedangkan metode *filter based kit* memiliki konsentrasi minimum 10 CFU/ml. Dari perbandingan metode, metode *filter based kit* memiliki *yield* yang lebih tinggi dari metode *heat treatment*.

**Kata Kunci :** isolasi DNA, *heat treatment*, *filter based kit*, *Escherichia coli*.

Korespondensi:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail:riorisandiansyah@unisma.ac.id

## The Comparison of *Escherichia coli* DNA Isolation Between Heat Treatment and Filter Based Kit Method Based on Limit of Detection and Limit of Quantification

Brilliant Nur Muhammad, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah  
Faculty of Medicine, Malang Islamic University

### ABSTRACT

**Introduction:** One simple and rapid DNA isolation method is by heat treatment. However, it unknown whether the result of this method has the same quality compared to the more commonly used filter based kit. This research aims compare heat treatment and filter based kit DNA isolation methods based on its limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) from DNA isolation yield from *E. coli*.

**Method:** This research is an *in vitro* laboratorium experimental research method. The *E. coli* concentration in this study is obtained through *purposive sampling* with a concentration of  $10^1 - 10^4$  CFU/ml. Heat treatment and filter based kit method are DNA isolation methods used in this study. The data analysis uses ANOVA and Least Significant Difference (LSD) test.

**Result:** Optimal yield of heat treatment method was found at a bacterial concentration of 10.000 CFU/ml ( $p=0.000$ ) and 1000 CFU/ml ( $p=0.002$ ). While the optimal yield of filter based kit was found at 10.000 CFU/ml ( $p=0.003$ ), 1000 CFU/ml ( $p=0.009$ ) and 100 CFU/ml ( $p=0.033$ ). The purity value of both heat treatment and filter based kit method did not reach 1,7-2,0. The heat treatment's LOD was 2,39 ng/ $\mu$ l, while the filter based kit's LOD was 4,06 ng/ $\mu$ l. The heat treatment's LOQ was 6, 43 ng/ $\mu$ l, while the filter based kit's LOQ was 8, 10 ng/ $\mu$ l.

**Conclusion:** According to limit of detection, the heat treatment method has the minimum bacterial concentration of 1000 CFU/ml. Whereas, the filter based kit method has the minimum bacterial concentration of 10 CFU/ml. Based on the method comparison, filter based kit method has higher yield than heat treatment method.

**Keyword:** DNA isolation, heat treatment, filter based kit, *Escherichia coli*

Corresponding:

Rio Risandiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail:riorisandiansyah@unisma.ac.id



## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan tingkat infeksi bakteri yang tinggi. Bakteri penginfeksi manusia antara lain berasal dari famili *enterobacteriaceae* yaitu bakteri *E. coli*. Pada kasus-kasus infeksi berat yang disebabkan bakteri *E. coli* seperti pada insiden sepsis yang sudah mengalami peningkatan dengan angka kematian yang terus bertambah. Setiap tahun diperkirakan 400.000-500.000 pasien mengalami sepsis di Eropa dan Amerika Serikat (Brooks *et al.* 2017). Metode diagnostik yang tepat dan efisien dapat mencegah pasien mengalami sepsis yang disebabkan oleh bermacam-macam jenis mikroorganisme penginfeksi seperti bakteri *E. coli* (Refdanita *et al.*, 2004). Bakteri *E. coli* memiliki karakteristik berbentuk basil dan jenis Gram negatif. Jenis bakteri Gram negatif memiliki lapisan dinding sel yang lebih tipis yaitu (10 nm) dari pada bakteri Gram positif yaitu (20-80 nm). Bakteri *E. coli* sebagai Gram negatif memiliki struktur dinding yang lebih kompleks dibandingkan bakteri Gram positif. Dinding bakteri *E. coli* tersusun atas *outer membran*, peptidoglikan dan *inner membran* (Cooper, 2007).

Saat ini tersedia metode deteksi berbasis DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Berkat metode *PCR*, agen penginfeksi yang bersifat patogen seperti beberapa jenis bakteri *E. coli* berhasil diidentifikasi dengan cara mengekstraksi asam nukleat dan mendeteksi sekuen asam nukleat spesifik dari materi genetik bakteri (Barnes *and* White, 2016). Metode *PCR* membutuhkan isolat

DNA sebagai bahan untuk deteksi karena *PCR* merupakan metode deteksi berbasis DNA yang membutuhkan kuantitas dan kualitas isolat DNA yang baik. Parameter yang digunakan untuk menghitung kuantitas isolat DNA adalah nilai *limit of detection* dan *limit of quantification*. *Limit of detection* merupakan batas terkecil analit dapat dideteksi pada suatu alat, sedangkan *limit of quantification* merupakan batas terkecil analit dapat dideteksi dan dihitung secara akurat pada suatu alat. Cara penentuan *limit of detection* dan *limit of quantification* yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan blanko. Parameter yang digunakan untuk menghitung kualitas isolat DNA adalah dengan mengukur nilai kemurniannya. *PCR* mampu mendeteksi isolat DNA dengan baik apabila Kuantitas dan kualitas isolat DNA juga baik (Arifah *et al*, 2016).

Isolasi DNA pada prinsipnya adalah mengambil DNA secara murni dengan cara menghilangkan komponen-komponen selain DNA. Metode isolasi DNA yang sudah dikenal adalah metode dengan kit komersial yaitu dengan *filter based kit*. Namun, metode *filter based kit* memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan alat sentrifugasi dengan kecepatan yang mencapai 16,000 g yang tidak tersedia pada semua laboratorium. Peralatan laboratorium khusus juga diperlukan dan filturnya tergolong khusus karena tidak bisa memakai kertas saring. Kelemahan-kelemahan tersebut dapat diatasi dengan metode isolasi DNA baru yang mempunyai waktu pengerjaan yang lebih murah dan sederhana sehingga dapat meminimalisir risiko terjadinya kesalahan dalam pengerjaan (Bioflux, 2018).

Perkembangan deteksi bakteri berbasis isolasi DNA saat ini sudah menghasilkan metode baru isolasi DNA yang dikenal dengan metode *heat treatment*. Metode ini menggunakan konsep *thermal lysis* dengan memanaskan bakteri pada air dengan suhu 100°C sehingga dinding bakteri akan *lysis* karena mengalami disintegrasi dan mengakibatkan komponen sel beserta DNA akan terlepas (Martin *et al*, 2006). Metode ini memiliki keunggulan seperti langkah-langkah yang dilakukan lebih sederhana dan waktu pengerjaan yang tidak lebih dari 2 jam. Waktu pengerjaan metode ini lebih cepat dari metode *filter based kit* karena metode ini tidak melibatkan proses penghilangan komponen bakteri dan pemurnian DNA bakteri.

Penghilangan proses isolasi DNA pada metode *heat treatment* menyebabkan efektifitas dan hasil dari metode *heat treatment* untuk isolasi DNA bakteri belum diketahui (Siwicki *et al*, 2006). Jumlah bakteri yang direkomendasikan dan batas terkecil metode *heat treatment* juga belum diketahui. Metode isolasi DNA yang digunakan harus dapat mendeteksi bakteri dengan jumlah  $10^1$ - $10^5$  CFU/ml sebagai syarat minimum dari diagnosis dini sepsis. Maka penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui metode diagnostik yang lebih efektif dan efisien secara klinis serta bermanfaat untuk proses diagnostik awal pada kasus infeksi bakteri.



## 1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Bagaimana perbandingan isolasi DNA bakteri *escherichia coli* dengan metode *heat treatment* dan *filter based kit* berdasarkan nilai *limit of detection* dan *limit of quantification*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Mengetahui perbandingan isolasi DNA bakteri *escherichia coli* dengan metode *heat treatment* dan *filter based kit* berdasarkan nilai *limit of detection* dan *limit of quantification*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan ilmiah tentang pengaruh metode isolasi terhadap keberhasilan perolehan DNA bakteri *E. coli*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Mengetahui efektifitas dari metode *heat treatment* dalam isolasi DNA bakteri Gram negatif untuk diagnosis berbasis DNA.

## BAB VII PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *Limit of detection yield* metode *heat treatment* adalah 2.39 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 1000 CFU/ml dan *limit of detection yield* metode *filter based kit* adalah 4.06 ng/μl yang didapatkan pada konsentrasi bakteri minimum 10 CFU/ml.
2. *Limit of quantification yield* metode *heat treatment* adalah 6.43 ng/μl dan *limit of quantification yield* metode *filter based kit* adalah 8.10 ng/μl. Konsentrasi *yield* metode *heat treatment* dan metode *filter based kit* tidak ada yang mencapai *limit of quantification*.
3. Metode *filter based kit* memiliki *yield* yang lebih tinggi pada setiap konsentrasi dari metode *heat treatment*. Sedangkan untuk kemurnian, metode *filter based kit* dan *heat treatment* tidak memiliki hasil baik.

### 7.2 Saran

Berdasarkan kelemahan yang ditemukan dalam penelitian, maka perbaikan dari kelemahan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Memastikan ketepatan jumlah reagen dari setiap langkah-langkah metode isolasi DNA.
2. Memastikan higienitas dari alat-alat yang digunakan.

3. Memodifikasi metode *heat treatment* dengan menambahkan proses penghilangan komponen sel dan presipitasi DNA.
4. Hasil tersebut mendorong peneliti untuk menyarankan penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan uji isolasi DNA. Penelitian lanjut menggunakan modifikasi *heat treatment* atau menggunakan media darah bertujuan untuk mengetahui efektifitas metode isolasi DNA pada darah yang memiliki kandungan yang beragam.



## DAFTAR PUSTAKA

- AAFL Bioflux, 2016, Volume 9, *Issue 2*. <http://www.bioflux.com.ro/aafl> diakses pada 27 april 2020
- Acheson J, 2000. "*Clearcutting Maine: Implications for the Theory of Common Property Resources*", *Human Ecology*.
- Anam, Choirul. 2010. "Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu". *Jurnal Pertanian MAPETA*. Vol. XII, No. 2, p: 72-144, ISSN: 1411-2817.
- Apriantono, A. dan D. Fardiaz 1989. *Analisa Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Arifah, Adini Qisthi and Mohamad Nadhan, Hani Nuramalina and Ismail, Shuhaib Ar Rummy and Raih, Mohd Firdaus and Muhamad Bunnori, Noraslinda and Mohamed Rehan, Aisyah 2016 *PCR amplification and cloning of six target genes from Burkholderia pseudomallei*. In: 33rd Symposium of the Malaysian Society for Microbiology 2016 Melaka.
- Ariyanti, N. K., Darmayasa, I. B. G., & Sudirga, S. K. (2012). Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*, 16(1), 1–4. Retrieved from <http://ojs.unud.ac.id/index.php/bio/article/download/5301/4057>
- Barnes, R. A. and P. L. White. 2016. *PCR technology for detection of invasive Aspergillosis*. *Journal of Fungi* 2 (23): 1-9.
- Bartlett, J.M.S., Stirling D. 2003. *PCR Protocols Second Edition. Methods in Molecular Biology*.



- Benson. 2001. *Microbial Application Lab Manual, 8th ed. California: The McGraw-Hill Companies.*
- Boyce WT. *Biobehavioral reactivity and injuries in children and adolescents. In: Bornstein MH, Genevro J, editors. Child development and behavioral pediatrics: Toward understanding children and health.* Mahwah, NJ: Erlbaum; 1996.
- Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, Sonntag A-K, Karch H. *Molecular profiling and phenotype 2005, analysis of Escherichia coli O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates.*
- Brooks., et al. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran.* Ed. 23. Jakarta : EGC.
- Brown, T. A. 2010. *Gene cloning and DNA analysis.* Blackwell Publishing, Oxford.
- Buwono, Ibnu Dewi, dan Rosidah. 2010 Uji sensitifitas metode *one step* dan *nested PCR* terhadap deteksi penyakit KHV pada ikan mas Mas (*Cyprinus carpio L.*). lembaga penelitian dan pengembangan, Universitas Padjadjaran
- Cheeptham, N. 2007. *Eosin Methylene Blue Agar.* <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2871-eosin-methylene-blue> Diakses 29 november 2019.
- Cooper TF (2007) *Recombination Speeds Adaptation by Reducing Competition between Beneficial Mutations in Populations of Escherichia coli.* *PLoS Biol* 5(9): e225. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050225> diakses 16 april 2020
- Dina M. Atef, M.D. and Rania A. Ghonaim, M.D 2014 *The Role of Vitek-2 Automated System in Identification and Susceptibility Testing of Gram Negative Rods in an Intensive Care Unit Patients in Egypt Med. J. Cairo Univ.*
- Dubreuil, J.D .2002. *Escherichia coli STb enterotoxin, Microbiology.*

- Dwidjoseputro, Prof.Dr.D. 1989. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Surabaya
- Engelkirk, P., G., Burton, G., R., W., 2009, *Burton's Microbiology for The Health Science, 8th Ed., 20-30, Lippincott William and Wilkins, New York.* Eslami G, Khalatbari-Limaki S, Ehrampoush MH, Gholamrezaei M, Hajimohammadi B, Oryan 2017, A. Comparison of Three Different DNA Extraction Methods for *Linguatula Serrata* as a Food Borne Pathogen. *Iran J Parasitol.*
- Eslava, C. F. Navarro-García, J.R. Czczulin, I.R. Henderson, A. Cravioto, J.P. Nataro, Pet, 2009, *an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli.*
- Ganjar, I.G., dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal. 419, 425.
- Goldmann, Emanuelle and Llorence H. Green. 2008. *Practical handbook of microbiology, second edition. florida; CRC Press*
- Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J. and Barer, M. 2007. *Medical Microbiology. Elsevier, China.*
- Gupte, Satish, 1990. Mikrobiologi Dasar. Terjemahan E.Suryawidjaja : *The Short Textbook of Medical Microbiology.* Bina rupa Aksara. Jakrata
- Guyton, Hall JE. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Terjemahan). 11 ed. Rachman RY, Hartanto H, Novrianti A, Wulandari N, editors. Jakarta: EGC; 2007. P. 223-231.
- Hadiutomo. 1990. Mikrobiologi Dasar Jilid I. Jakarta: Erlangga
- Hardjoeno UL. 2007. Kapita selekta hepatitis virus dan interpretasi hasil laboratorium. Makassar: Cahya Dinan Rucitra.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya, Departemen FMIPA UI. Depok.

Hidayah Murtiyaningsih, 2017 isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (*random amplified polimorphic DNA*) universitas muhammadiyah jember.

Hogg. 2005. *Essential Microbiology. The University of Glamorgan*, Jhon Wiley & Sons, Ltd, UK.

<https://www.biomerieux-usa.com/vitek-2> diakses pada 29 november 2019

<http://www.thermofisher.com/e.coli/macconkey> Diakses 30 november 2019

Irina Afonina, Irina Ankoudinova, Alan Mills, Sergey Lokhov, Phan Huynh, and Walt Mahoney *Primers with 5' flaps improve real-time PCR*, Phan Huynh, Nanogen, USA.

Jawetz *et al.* 2008. *Medical Microbiology. 24th ed. North America: Lange Medical*

Kamaliah, 2017, perbandingan metode ekstraksi DNA *phenol-chloroform* dan kit extraction pada sapi Aceh dan sapi Madura, 5(1), pp. 60–65.

Karmana Oman. 2008. *Biologi Jakarta: PT Grafindo Media Pratama.*

Larry Maturin and James T. Peeler, 1998 *bacteriological analytic manual*, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> diakses pada 12 Mei 2020

Leboffe, M. and Pierce, B. 2012. *Microbiology*. Englewood, CO: Morton Pub.

Lim D. 1998. *Microbiology*. Edisi ke-2. *New York: McGraw-Hill.*

Li, X., Kuromi, H, Briggs, L, Green, D.B, Rocha, J.J, Sweeney, S.T, Bullock, S.L. (2010). *Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling*. *EMBO J.* 29(5): 992-1006.

Mai prochnow, A. *et al.* 2016, *Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma*, *Nature Publishing Group. Nature Publishing Group.*



- Martin, N.C. Pirie AA. Ford, L.V. Challaghan, C.L Me Turk, K. Lucy, D and scringer, D.G. 2006 *the use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. Science and justice*, 46 (3);179:184
- Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., Griffin, P. Taux e, R. (1999) *Food-related illness and death in the United States. Emerge.Infect.*
- Muladno. 2002. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. 2009, *Biokimia harper (27 ed.)*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC;
- Mulyani, Y., A. Purwanto., I. Nurruhwati. 2011. Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. *Jurnal Akuatika* Vol. II No. 1/Maret Tahun 2011
- Neil MO, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, Mc Millan ND. 2011. *Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference Qubit system. J Phys Conference Series*.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, et al. 2006. *Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in brest cancer. BMC Clin Path J* 6(2):1- 8, ([http://www. Biomedcentral.com](http://www.Biomedcentral.com), diakses 3 Mei 2020).
- Palumbi, S. R. 1986. *Nucleid acid II: polymerase chain reaction*. In: D. M. Hillis, C. Moritz dan B. K. Mable (Editor). *Molecular Systematics. 2nd Edition*. Sinauer Associates. Inc., Massachusetts USA.



Parsot C. 2005. *Shigella spp. and enteroinvasive E. coli pathogenicity factors*, FEMS Microbiol. Prescott, L.M., Harley, J.P Klein D.A. 2008. *Microbiology*, William C. Brown Publishers, Dubuque, IA, USA.

Phua J, Koh Y, Du B, et al. Management of severe sepsis in patients admitted to Asian intensive care units: prospective cohort study. BMJ. 2011;342:d3245.

Prescott, L.M. 2002. Prescott Harley Klein: *Microbiology 5th Edition*. USA: The McGrawth-Hill Companies.

Purwoko. T. 2007. Fisiologi Mikroba. Bumi Aksara. Jakarta.

Radji, Maksum. 2010. Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran. Jakarta: EGC.

Refdanita, Maksum, Nurgani A, dan P. Endang. 2004. Pola kepekaan bakteri terhadap antibiotika di ruang rawat intensif rumah sakit Fatmawati Jakarta Timur tahun 2001-2002. Buku Kesehatan 8: 41-48.

Richards M, Thursky K, Buising K. *Epidemiology, prevalence, and sites of infections in intensive care unit*. 2003 diakses pada 27 April 2020. Available from : <http://www.medscape.com/>

Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. (1989). "*Molecular cloning: A laboratory manual*". USA: Cold Spring Harbor Lab ress.

Sambrook, J. dan Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3 th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Shi, R., Lewis, R. S. and Panthee, D. R. (2018) '*Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification*', pp. 1-14.

Siwicki, A.K. A. Lepa, J. Malaczewska, B. Kazun, K. Kazun, and E.T. Majewska. 2006. *Isolation and identification of Carp Interstitial Nephritis and Gill*

*Necrosis (CNGV) in fingerling common carp (Cyprinus carpio L).*  
*Arch.Pol.Fish.* 14 (2): 157 – 167.

Stapleton, P., R. Pike, P. Mullany, V. Lucas, G. Roberts, R. Rowbury, M. Wilson, and H. Richards. 2004. *Mercuric resistance genes in gram-positives oral bacteria.* *FEMS Microbiology Letters.*

Sukmawati., Ratna. & Fahrizal, A. (2018). Analisis Cemaran Mikroba pada Daging Ayam Broiler di Kota Makassar. *Jurnal Scripta Biologica*, 5(1), 68-71. YULIA “Validasi Metode” Diktat Validasi Metode, Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Bandung, 2010.

Sulastri. 2012. Tanah Pasir Pantai. <http://eprints.uny.ac.id/8190/3/bab%20%20-%2005308141009.pdf>. Diakses tanggal 30 April 2020

Sumarsih, S., 2003. *Mikrobiologi Dasar.* Universitas Pembangunan Nasional Veteran, Yogyakarta.

Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar.* Jakarta: Paps Sinar Sinanti.

Whittam, T.S. et. al.2011. *Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*, *J. Clin. Invest.*107;539–548.