

Variasi Temperatur Boiling pada Amplifikasi Gen inhA *M.tuberculosis* Metode PCR

Fihiruddin^{1*}, Hanifa Falahul Ilmi², dan Ari Khusuma³

^{1,2,3}Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Mataram

*E-mail: fihir.analis@yahoo.co.id

Abstrak

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode yang direkomendasikan oleh *world health organization* (WHO) untuk pemeriksaan infeksi tuberkulosis dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Biaya yang murah, proses yang mudah, dan tehnik ekstraksi DNA yang cepat sangat diperlukan untuk mendapatkan DNA template. Salah satu cara untuk mendapatkan DNA template adalah metode boiling, dimana metode ini dapat meningkatkan permeabilitas dan merusak dinding sel hanya dengan pemanasan dalam waktu relatif singkat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi suhu boiling 85°C, 90°C, dan 95°C masing-masing selama 30 menit, 10 menit dan 5 menit terhadap hasil amplifikasi gen inhA *M. tuberculosis* menggunakan metode PCR. Penelitian ini merupakan penelitian *True Experiment* dengan rancangan *posttest only control design*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah dahak penderita TB yang di ekstraksi dengan metode boiling dan dibandingkan dengan metode ekstraksi kit. Hasil amplifikasi di elektroforesis pada gel agarosa 1% yang diamati dengan alat UV transiluminator. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi sampel sputum dengan boiling pada suhu 85°C selama 30 menit, 90°C selama 10 menit dan 95°C selama 5 menit masing-masing ditemukan pita DNA gen inhA *M.tuberculosis* dengan panjang 465 bp. Ekstraksi sampel sputum dengan metode boiling dapat digunakan untuk pemeriksaan gen inhA *M.tuberculosis* metode PCR.

Kata kunci: Boiling, *M.tuberculosis*, PCR

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi paru menular yang disebabkan oleh bakteri *M. tuberculosis*. TB saat ini masih merupakan masalah kesehatan global sehingga diperlukan cara-cara pengendalian TB nasional secara terus menerus. Program pencegahan TB difokuskan pada peningkatan penemuan kasus baru, deteksi dan treatment yang cepat, ekstensifikasi serta inovasi program untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal (Kusuma *et al.*, 2018; Primadi, 2020). Salah satu strategi 'End TB' WHO diarahkan pada pengembangan dan penggunaan alat diagnostik yang lebih baru, khususnya pemeriksaan sampel pasien dengan diagnostik yang cepat seperti pemeriksaan dengan metode PCR (Ainley and Kon, 2020). Pemeriksaan metode PCR memiliki beberapa kelebihan diantaranya memiliki sensitifitas tinggi, sangat cepat, mampu mendeteksi berbagai jenis mikroorganisme dalam kondisi masih hidup atau sudah mati (Irianto, 2017). Gen inhA adalah salah satu gen penyandi resistensi *M. tuberculosis* yang dapat di perbanyak dengan metode PCR menggunakan primer yang spesifik (Maitriani *et al.*, 2014). Gen inhA ini adalah suatu *enoyl-acyl carrier protein* (ACP) *reductase* yang dipakai sebagai gen target untuk mengetahui resistensi INH dan *etionamid* (ETH) (Iriatni *et al.*, 2012).

Salah satu langkah kunci untuk memastikan hasil yang tepat, konsisten dan berhasil dalam teknik PCR adalah ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA merupakan suatu usaha memisahkan materi genetik (DNA) dari komponen sel lainnya seperti lemak, karbohidrat, protein dan lain-lain. Ekstraksi DNA terdiri dari tiga proses yakni melisis dinding sel, pemisahan bagian-bagian sel dengan DNA serta pemurnian DNA (Barbosa *et al.*, 2016; Hutami *et al.*, 2018) Proses perusakan dinding sel dalam ekstraksi untuk DNA ada beberapa teknik yaitu secara kimiawi, enzimatik, dan secara fisika dimana semua metode ekstraksi DNA tersebut membutuhkan biaya yang mahal, melibatkan bahan kimia berbahaya serta memakan waktu yang lama sehingga perlu mencari metode alternatif lain yang lebih mudah, murah dan efektif. Salah satu cara untuk mendapatkan ekstrak DNA adalah dengan metode *boiling*. Ekstraksi DNA dengan metode *boiling* mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya adalah biayanya relatif murah, mudah dikerjakan, tidak memerlukan waktu yang lama dan lebih aman bagi

lingkungan (Silva *et al*, 2012; Osmundson *et al.*, 2013). Pada metode *boiling*, ekstraksi DNA dilakukan dengan memberikan pemanasan terhadap sel dengan suhu tinggi. Suhu yang diperlukan dan lamanya waktu pemanasan sangat dipengaruhi oleh sampel yang digunakan. Pemanasan menggunakan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dan merusak dinding sel sehingga mengakibatkan terjadinya perpindahan cairan dan molekul di sekitar sel dengan komponen-komponen yang berada dari dalam sel (Sunarno *et al.*, 2014; Afif and Putri, 2019). Penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Kabir (2018) berhasil mengekstrak DNA dengan metode *boiling* pada suhu 85°C selama 30 menit dari sampel sputum untuk mendeteksi *M. tuberculosis* pada anak-anak menggunakan primer IS6110. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh variasi suhu *boiling* 85°C, 90°C, dan 95°C masing-masing selama 30 menit, 10 menit dan 5 menit terhadap hasil amplifikasi gen *inhA M. tuberculosis* menggunakan metode PCR.

METODE/EKSPERIMEN

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experiment* menggunakan rancangan *posttest only control design*. Bahan pemeriksaan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel dahak penderita TB yang diperoleh dari Puskesmas Kediri, Puskesmas Labuapi dan Puskesmas Gunung Sari Kabupaten Lombok Barat. Sampel Sputum yang telah dikumpulkan dari penderita tuberkulosis di ekstraksi dengan metode *boiling* dan dibandingkan dengan metode ekstraksi kit. Sampel yang diperiksa dalam penelitian ini yaitu sputum yang telah diperiksa secara mikroskopis dan menunjukkan hasil pemeriksaan BTA positif. Sputum yang telah dikumpulkan dari penderita tuberkulosis, terlebih dahulu diklorinasi dengan detergent sebagai larutan *bleaching* selama 30 menit dan di cuci sebanyak 3 kali dengan larutan NaCl fisiologis. Sampel selanjutnya dibagi ke dalam 4 wadah yang berbeda, yaitu 3 sampel untuk ekstraksi metode *boiling* dan satu sampel untuk ekstraksi dengan menggunakan kit (DNA extraction kit, Qiagen). Ekstraksi sampel dari isolat murni bakteri *M. tuberculosis* yang di peroleh dari media *Lowenstein Jensen Agar* digunakan sebagai kontrol kit ekstraksi.

Ekstraksi dengan metode *boiling* dilakukan dengan cara sediment dari hasil pencucian sampel sputum disuspensikan ke dalam 200 ml akuadest steril kemudian di inkubasi pada suhu 80°C, 90°C, dan 95°C masing-masing selama 30 menit, 10 menit dan 5 menit. Hasil ekstraksi didinginkan selama 2 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang didapatkan digunakan untuk pemeriksaan PCR. Pengukuran konsentrasi DNA bakteri hasil ekstraksi dilakukan dengan alat *NanoDrop™2000/2000c Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). Alat *NanoDrop* dibersihkan dengan *distilat water*. Ditambahkan 2 µl akuadest steril (*nuclease free water*), klik panjang gelombang yang digunakan pada komputer. Alat nanodrop dibersihkan kembali dengan 2 µl larutan NFW. Sampel yang digunakan dalam pemeriksaan ini sebanyak 2 µl. Konsentrasi DNA (µg/µl) yang diperoleh di catat dan data di simpan pada alat.

DNA hasil ekstraksi sampel sputum di periksa dengan metode PCR menggunakan *forward primer* 5'-CGTCGATCGCGTTTCACATC-3' dan *reserve primer* 5'-ACCTGTTGACCGACTCCAAC-3' yang spesifik terhadap gen *inhA M.tuberculosis*. Proses amplifikasi PCR dilakukan dalam volume total 25 µl, yang terdiri dari 12,5 µl PCR mix, 6,5 µl H₂O, 2,0 µl *forward primer* 2,0 µl *reserve primer* dan 2,0 µl DNA *template* dilakukan sebanyak 40 siklus dengan suhu pre denaturasi 95°C selama 5 menit, suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 54°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit dan post ekstensi 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa 1% selama 25 menit menggunakan arus 100 volt dan divisualisasi dengan UV transiluminator

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Metode *boiling* mampu mengekstrak DNA dari sampel sputum dengan cara dipanaskan dan di inkubasi pada *waterbath*, sehingga permeabilitas dinding sel bakteri meningkat yang mengakibatkan cairan di sekitar sel akan masuk dan materi-materi dari dalam sel seperti DNA akan keluar. DNA yang

telah didapatkan dipisahkan dengan pemutaran, sehingga materi selain DNA akan mengendap pada dasar tabung sedangkan DNA terdapat dalam supernatant. Pengukuran konsentrasi DNA *M.tuberculosis* dilakukan dengan NonoDrop *Spectrophotometer* sebelum sampel DNA diamplifikasi. Pengukuran konsentrasi DNA pada setiap perlakuan ekstraksi dengan sampel sebanyak 15. Hasil pemeriksaan konsentrasi DNA terlihat pada tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Perbandingan konsentrasi DNA yang diekstraksi dengan proses boiling dan ekstrak kit

Sampel	Positivitas	Konsentrasi DNA (ng/μl)			
		85°C	90°C	95°C	Ekstraksi kit
1.	1+	0.24	0.12	0.46	1.32
2.	1+	0.26	0.21	0.32	1.42
3.	3+	3.24	3.31	1.30	4.32
4.	2+	0.46	0.66	0.91	2.42
5.	1+	0.18	0.48	0.32	1.22
6.	3+	1.24	1.31	1.22	3.32
7.	2+	0.52	0.55	0.56	1.95
8.	3+	1.18	1.26	1.97	4.41
9.	1+	0.66	0.71	0.76	2.22
10.	1+	0.64	0.68	1.02	1.76
11.	2+	0.74	0.61	1.22	3.32
12.	1+	0.58	0.65	0.62	1.12
13.	2+	0.36	0.38	0.48	2.73
14.	2+	1.08	1.11	1.84	2.24
15.	3+	1.14	1.06	1.16	3.67
Rata-rata		0.83	0.87	0.94	2.49

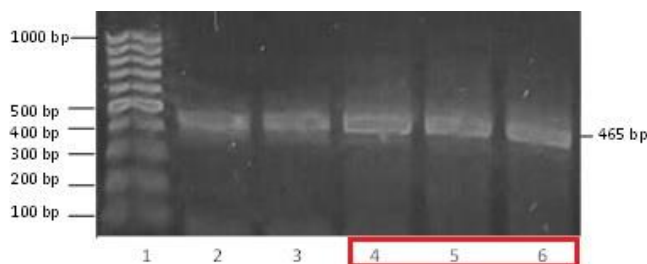
Keterangan: 1+ : ditemukan 10-99 BTA/100 lapang pandang
 2+ : ditemukan 1-10 BTA/lapang pandang
 3+ : ditemukan > 10 BTA/lapang pandang

Tabel 2. Rata-rata perbandingan kemurniaan DNA yang di ekstraksi dengan proses boiling dan ekstraksi dengan kit

Perlakuan sampel sputum	Rata-rata rasio (A260/A280)	Kemurnian DNA
Ekstraksi suhu 85°C	1.18	rendah
Ekstraksi suhu 90°C	1.11	rendah
Ekstraksi suhu 95°C	1.23	rendah
Ekstraksi kit	1.88	tinggi

Kemurnian hasil ekstraksi metode boiling dapat ditentukan dengan mengukur kemurnian DNA terhadap protein. Perbandingan Absorbansi DNA dan protein yang baik memiliki nilai A260/A280 yaitu 1,8 - 2,0. Hasil pengukuran kemurnian DNA yang diperoleh dari proses boiling masih berada pada nilai dibawah 1,8 yang berarti tingkat kemurniaan DNA yang diperoleh masih rendah. Ekstraksi dengan kit menunjukkan rasio A260/A280 berada di atas nilai 1,8 yaitu 1,88.

Hasil ekstraksi DNA dari sampel sputum menggunakan metode *boiling* menghasilkan DNA murni yang masih dapat teramplifikasi dengan metode PCR, walaupun tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan masih relative rendah. Hasil amplifikasi gen inhA *M. tuberculosis* dari sampel yang diekstraksi dengan metode boiling masih menunjukkan pita yang bagus, hal ini ditunjukkan dengan hasil elektroforesis pada gel agarose 1%. Pada penelitian ini, pita yang muncul berada di antara marker ke-4 dan ke-5 yaitu pada marker 400-500 bp (Gambar 1), hal ini dikarenakan penggunaan primer gen inhA yang dirancang dengan panjang sekuens 465 bp. Adanya pita dengan panjang sekuens 465 bp tersebut menandakan bahwa pada sampel positif terdapat bakteri *M. tuberculosis*.



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA gen *inhA M.tuberculosis* pada agarosa 1%. garis 1; Marker DNA, garis 2; DNA dari isolat *M.tuberculosis* yang diekstraksi dengan DNA extraction kit. garis 3; DNA dari sampel sputum yang diekstraksi dengan DNA extraction kit. Garis 4; ekstraksi sputum dengan metode boiling pada suhu 85°C selama 30 menit; garis 5; ekstraksi sputum dengan metode boiling pada suhu 90°C selama 10 menit, dan garis 6; ekstraksi sputum dengan metode boiling pada suhu 95°C selama 10 menit.

Pembahasan

Pemeriksaan yang akhir-akhir ini banyak dikerjakan untuk mendiagnosis pasien tuberkulosis di seluruh dunia adalah pemeriksaan PCR TB. Metode PCR adalah pemeriksaan molekular yang didasarkan pada amplifikasi bagian asam nukleat tertentu yang spesifik dari *M. tuberculosis* (Kuswandani *et al.*, 2010). Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu tehnik molekular untuk mendeteksi *M. tuberculosis* dari sampel sputum selain pemeriksaan mikroskopik dan kultur bakteri. Teknik PCR mempunyai sensitivitas yang sangat tinggi untuk mendeteksi kuman TBC dari sampel sputum. PCR merupakan tehnik memperbanyak DNA target dari *M. tuberculosis* secara *in vitro*. Proses amplifikasi DNA ini membutuhkan DNA template (DNA sampel) *double helix* yang mengandung DNA target, *enzim Taq polymerase*, *primer forward*, *primer reverse* dan nukleotida trifosfat (Ramadhan *et al.*, 2017). DNA template pada penelitian ini diperoleh dengan cara *boiling* (perebusan) pada beberapa temperatur yaitu 85°C, 90°C dan 95°C dengan waktu masing-masing adalah 30 menit, 10 menit dan 5 menit.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata konsentrasi DNA yang diperoleh dengan Metode *boiling* pada suhu 85°C, 90°C dan 95°C masing-masing adalah 0.83 ng/μL, 0.87 ng/μL, dan 0.94 ng/μL, sedangkan ekstraksi DNA dengan menggunakan kit diperoleh rata-rata konsentrasi DNA sebesar 2.49 ng/μL. Konsentrasi DNA yang diperoleh dengan ekstraksi kit menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibanding dengan metode *boiling* karena pada ekstraksi metode kit dilakukan pemisahan DNA dari sel melalui tiga tahapan utama yakni perusakan dinding sel (lisis), pemisahan materi genetik (DNA) dari komponen-komponen sel yang lain seperti protein, karbohidarat, lemak dan lain-lain selanjutnya dilakukan pemurniaan DNA. Tiga tahapan ekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi menghasilkan konsentrasi DNA lebih tinggi dibandingkan metode boiling. Penggunaan silikon dioksida pada spin kolom pada kit ekstraksi mampu mengikat DNA sel yang bebas. Absorpsi DNA dapat terjadi pada spin kolom karena tingginya afinitas muatan negatif rantai DNA terhadap partikel silika yang bermuatan positif (Hutami *et al.*, 2018).

Pengukuran hasil kemurnian ekstrak DNA ditemukan bahwa ekstrak DNA yang di dapat dengan proses ekstraksi kit mempunyai tingkat kemurnian yang lebih baik dibandingkan ekstraksi DNA menggunakan *boiling* yaitu di atas 1,8. Walaupun kemurniaan DNA metode *boiling* masih rendah akan tetapi masih memenuhi persyaratan untuk diperiksa metode PCR. Hasil amplifikasi *gen inhA* dari sampel yang diekstraksi dengan metode boiling menunjukkan pita yang jelas dan sesuai dengan panjang gen target. Perbedaan tingkat kemurniaan DNA yang diekstraksi dengan metode *Boiling* dan ekstraksi kit disebabkan karena pada metode *boiling* tidak dilakukan pemisahan DNA dengan komponen-komponen sel secara spesifik sehingga kontaminasi protein pada sampel masih tinggi. Pemisahan DNA dengan komponen-komponen sel dilakukan dengan sentrifugasi, dimana tidak semua protein dan komponen-komponen sel dapat terendapkan secara sempurna.

Hasil pemeriksaan pada penelitian ini didapatkan bahwa sampel sputum yang diekstraksi dengan metode *boiling* pada suhu 85°C, 90°C dan 95°C dapat teramplifikasi dengan metode PCR dengan panjang gen target 465 bp. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Afif dan Putri (2019) telah berhasil mengisolasi DNA bakteri endofit dengan metode *boiling* pada suhu 95-100°C selama 15 menit namun pada penelitian ini sampel yang diekstraksi hanya dari koloni bakteri. Penelitian lain yang dilakukan oleh Kabir dkk (2018) yang berhasil mengekstraksi DNA dari sampel sputum dengan suhu *boiling* 85°C selama 30 menit sejalan dengan penelitian yang kami dilakukan. Munculnya pita dengan panjang sekuens 465 bp pada posisi yang sama antara ekstraksi dengan metode kit dari sampel isolat kultur maupun sputum dengan ekstraksi menggunakan metode *boiling* menandakan bahwa metode *boiling* memiliki kemampuan yang sama dalam menghasilkan DNA murni yang diinginkan. Metode ekstraksi dengan kit telah terbukti dapat digunakan sebagai metode ekstraksi DNA, namun demikian harga reagen yang mahal, proses pengerjaan yang rumit dan waktu ekstraksi yang relative lama menjadi kelemahan metode ini (Abdel-latief and Osman, 2018). Berbeda dengan metode *boiling*, dimana metode ini dapat dilakukan dengan cara yang mudah, ekonomis dan cepat. Hasil penelitian Parvez (2003) menunjukkan bahwa akurasi pemeriksaan PCR mempunyai sensitivitas 92% dan spesifisitas 70%. Penelitian yang dilakukan oleh Negi *et al*, (2005) di India mendapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan PCR pada pasien TB dewasa adalah 74,4% dan 97,3%.

Hasil amplifikasi PCR dapat tidak terbaca pada saat elektroforesis disebabkan oleh beberapa hal. Tahapan pra analitik, analitik dan pasca analitik harus diperhatikan untuk mendapatkan ekstrak DNA murni. Diawali dari proses pencucian sampel harus menggunakan akuadest yang steril karena jika aquadest terkontaminasi bahan lain maka residu dari larutan klorin tidak dapat dibersihkan dengan baik sehingga dapat menyebabkan DNA yang diperoleh masih mengandung bahan kontaminan yang dapat mengganggu hasil pemeriksaan. Proses pemipetan reagen juga sangat menentukan hasil amplifikasi PCR, reagen harus di inkubasi dalam suhu ruang dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk mencegah bahan-bahan yang ada di dalam reagen tidak mengendap di dasar tabung. Selain itu, pada saat proses elektroforesis, ketebalan dari gel agarosa harus diperhatikan agar marker dan sampel dapat terpisah dengan sempurna. Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu proses ekstraksi dilakukan dalam *waterbath* sehingga suhu harus terus dimonitor agar tetap stabil, selain itu pencampuran reagen dan sampel harus dilakukan secara steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

PENUTUP

Berdasarkan data-data penelitian yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa hasil amplifikasi gen inhA *M. tuberculosis* metode PCR pada suhu *boiling* 85°C, 90°C, dan 95°C selama masing-masing 30 menit, 10 menit, dan 5 menit terbentuk pita DNA dengan panjang sekuens 465 bp, dimana suhu *boiling* 95°C selama 5 menit merupakan suhu optimum yang dapat digunakan sebagai metode ekstraksi DNA dari sampel sputum.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tehni Laboratorium Biologi Molekular Jurusan Teknologi Laboartorium Medis, Poltekkes Kemenkes Mataram dan Laboratorium Biokima Bioteknologi Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1–10.
- Afif, R., & Putri, D. H. (2019). 16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds. *Bio Sains*, 4(1), 63–71.
- Ainley, A., & Kon, O. M. (2020). Clinical tuberculosis. *Medicine*, 48(6), 356–362.
- Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., & Chaves, S. (2016). DNA extraction: Finding the most

- suitable method. In *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*.
- Hutami, R., Bisyri, H., Sukarno, S., Nuraini, H., & Ranasasmita, R. (2018). Ekstraksi DNA dari daging segar untuk analisis dengan metode loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Jurnal Agroindustri Halal*, 4(2), 209–216.
- Irianto, K. (2017). *Biologi Molekuler*. Bandung: Alfabeta.
- Iriatni, Kuswadi, Yasin, N., & Kusumaningtyas, R. (2012). Mengenal Anti-Tuberculosis. *Current Bioactive Compounds*, 2(1), 105–105.
- Kabir, S., Uddin, M. K. M., Chisti, M. J., Fannana, T., Haque, M. E., Uddin, M. R., and Ahmed, T. (2018). Role of PCR method using IS6110 primer in detecting Mycobacterium tuberculosis among the clinically diagnosed childhood tuberculosis patients at an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *International Journal of Infectious Diseases*, 68, 108–114.
- Kusuma, S. A. F., Parwati, I., Rostinawati, T., Yusuf, M., Fadhlillah, M., Tanti, L. D., and Subroto, T. (2018). Construction and expression of synthetic gene encoding MPT64 as extracellular protein in escherichia coli BL21 (DE3) expression system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(10), 2659–2665.
- Kuswandani, N., Setyanto, D.B., Rahajoe, N.N. (2010). Akurasi polymerase chain reaction (PCR) dibandingkan dengan uji tuberkulin untuk diagnosis tuberkulosis pada anak. *Sari Pediatri*. 12(1), 42-46
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2016). Desain primer untuk amplifikasi fragmen gen inha isolat 134 multidrug resistance tuberculosis (mdr-tb) dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 2, 20–24.
- Negi, S.S., Khan, S.F.B., Gupta, S., Pasha, S.T., Khare, S., Lal, S. (2005). Comparison of the conventional diagnostic modalities, Bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. *Indian J Med Microbiol*. 23(1), 29-33.
- Osmundson, T. W., Eyre, C. A., Hayden, K. M., Dhillon, J., & Garbelotto, M. M. (2013). Back to basics: An evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 66–74.
- Parvez, M.A.K., Hasan, K.N., Rumi, M.A.K. (2003). PCR can help early diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 34(1), 147-53.
- Primadi, O. (2020). Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2019. In *Kementrian Kesehatan Republik Indonesia* (Vol. 42).
- Ramadhan, R., Fitria, E., & Rosdiana. (2017). Deteksi Mycobacterium tuberculosis dengan pemeriksaan mikroskopis dan tehnik PCR pada penderita tuberkulosis paru di Puskesmas Darul Imarah. *Jurnal Penelitian Kesehatan*. 4(2),73-80
- Silva, A., Bernardi, L., Schaker, D. C., Menegotto, M., & 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.
- Sunarno, Muna, F., Fitri, N., Malik, A., Karuniawati, A., & Soebandrio, A. (2014). Metode cepat ekstraksi dna corynebacterium diphtheriae untuk pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit. Kesehat*, 42(2), 85–92.