

PEMANFAATAN SILIKAT BENTONIT TERSUSPENSI NaCl, MgCl₂, DAN CaCl₂ UNTUK ISOLASI DNA METAGENOMIK DARI TANAH HUTAN MANGROVE

Luh De Dwi Jayanthi, Ida Ayu Gede Widihati, dan I Nengah Wirajana*

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

**Corresponding author : nwirajana@gmail.com*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove Pantai Suwung Kauh Bali dengan menggunakan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂. Isolasi DNA metagenomik dilakukan dengan metode lisis sel secara langsung dari tanah dengan menggunakan buffer lisis dan dengan kejutan-pemanasan, serta dilanjutkan dengan ekstraksi DNA dengan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂. Preparasi suspensi silikat bentonit dilakukan dalam larutan 1 M NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂. Hasil isolasi DNA metagenomik dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa dan spektrofotometer nano pada panjang gelombang 230, 260, dan 280 nm. Hasil analisis dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa DNA tidak terdeteksi pada elusi pertama dari semua suspensi, namun DNA hanya terdeteksi pada supernatan pertama sebelum elusi dari suspensi Na-bentonit dan Mg-bentonit. Pita DNA paling tebal diperoleh pada supernatan pertama dari suspensi Na-bentonit. Hasil ini mengindikasikan bahwa kemampuan adsorpsi Na-bentonit terhadap DNA metagenomik lebih rendah daripada suspensi lainnya. Pita DNA tidak terdeteksi pada supernatan pertama dan hasil elusi pertama dari suspensi Ca-bentonit yang mengindikasikan bahwa DNA teradsorpsi lebih kuat daripada yang lain dan belum dapat terlepas dari suspensi ini pada elusi pertama. Hasil spektrofotometer nano menunjukkan bahwa DNA metagenomik yang diisolasi dengan menggunakan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂ masih terkontaminasi asam humat dan protein.

Kata kunci : DNA metagenomik, tanah hutan mangrove, bentonit

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the isolated metagenomic DNA of mangrove soil in Suwung Kauh Beach, Bali by utilizing suspended bentonite of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂. The metagenomic DNA isolation was performed by directly lysis method from soil with lysis buffer and heat-shock, and then continued by DNA extraction with suspended bentonite of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂. Preparation of suspended bentonite was done in 1 M NaCl, MgCl₂ and CaCl₂. The results of metagenomic DNA isolation were analysed by gel agarose electrophoresis and spectrophotometer Nano at wave length 230, 260, and 280 nm. The results of gel agarose electrophoresis showed that DNA was not detected in the first elution from all suspended bentonite, but DNA was only detected in the first supernatant before elution from Na-bentonite and Mg-bentonite suspended. The DNA bands were most thick in the supernatant before the elution of Na-bentonite. This result indicated that Na-bentonite adsorption to metagenomic DNA was lower than the other bentonite suspended. The DNA band was not detected in the first supernatant and the first elution from Ca-bentonite that indicated that DNA adsorption was stronger than the other and was not breakable from this suspended. The results of spectrophotometer nano showed that the metagenomic DNA isolated by suspended bentonite of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ were contaminated by humic acid and protein.

Keywords : DNA metagenomic, mangrove soil, bentonite

PENDAHULUAN

Metagenomik merupakan teknik baru dalam eksplorasi enzim secara langsung dari

mikroorganisme tanpa didahului dengan kultivasi. Eksplorasi enzim secara metagenomik diawali dengan isolasi DNA total secara langsung dari lingkungan dalam rangka pembuatan pustaka

metagenom. Pustaka metagenom ini berupa koloni-koloni yang mengandung berbagai macam materi genetika, diantaranya gen penyandi enzim yang akan dicari (Handelsman, 2004). Metode metagenomik dapat digunakan untuk eksplorasi genom mikroba total tanpa melalui tahap kulturisasi mikroba (Uchiyama & Mizaki, 2009; Schmeisser *et al.*, 2007).

DNA metagenomik telah berhasil diisolasi dari tanah hutan mangrove Pantai Suwung Kauh Bali pada penelitian sebelumnya (Wirajana *et al.*, 2013; Widiartha *et al.*, 2014). DNA metagenomik yang diperoleh masih mengandung kontaminan seperti asam humat dan protein. Menurut Schneegurt (2003), asam humat merupakan kontaminan terbesar yang dapat mengganggu tahapan pembuatan pustaka metagenom, karena senyawa ini dapat menghambat enzim-enzim yang berperan dalam kloning gen, seperti enzim restriksi, ligase dan DNA polimerase.

Clearly (2012) telah melakukan penelitian tentang adsorpsi DNA dari *Calf Thymus* (Sigma-Aldrich) menggunakan suspensi lempung. Jenis lempung yang digunakan yaitu bentonit, kaolinit dan SiO₂ yang masing-masing tersuspensi dalam larutan NaCl, CaCl₂, MgCl₂. Adsorpsi DNA menggunakan larutan CaCl₂ lebih baik daripada menggunakan MgCl₂ dan NaCl untuk ketiga jenis lempung tersebut. Penggunaan bentonit yang tersuspensi dalam NaCl, MgCl₂, dan CaCl₂ untuk isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan hasil isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove Pantai Suwung Kauh Bali dengan menggunakan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂.

MATERI DAN METODE

Bahan

Tris-HCl, EDTA, NaOH, SDS, etanol 70%, aquades steril, susu skim, silikat bentonit, aqua DM (de-mineralisasi) NaCl, CaCl₂, MgCl₂, buffer TE 10/0,1 pH 8, agarosa, buffer TAE (Tris-asetat 40mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8), *loading buffer*1x, cairan *flourosif*, sampel tanah hutan mangrove.

Peralatan

Gelas Beaker, gelas ukur, Erlenmeyer, kaca arloji, labu ukur, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, kuvet, spatula dan batang pengaduk. botol semprot, bola hisap, spatula, mikro pipet, kuning (200 µL), dan biru (1000 µL), dan tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), *Nano Spectrophotometer* P300, alat elektroforesis horizontal (*Mupid 2 Plus*), neraca analitik, termometer, autoklaf, *magnetic stirer*, vorteks, *shaker*, *Centrifuge Hettich* EBA III, *GelDoc Enduro GDS*.

Cara Kerja

Preparasi Suspensi Bentonit

Preparasi suspensi bentonit ini berdasarkan Clearly (2012) termodifikasi, sebanyak 0,5 gram bentonit diresuspensi dalam 5 mL larutan NaCl 1 M, MgCl₂ 1M dan CaCl₂ 1M diaduk selama 2 jam menggunakan stirer. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikro masing-masing sebanyak 1 mL kemudian masing-masing ditambahkan sebanyak 1 mL larutan NaCl 1 M, MgCl₂ 1M dan CaCl₂ 1M. Suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 10.000xg pada suhu kamar selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian dibuang. Perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali. Setelah diperoleh pelet pada pengulangan sentrifugasi ketiga, lalu ditambahkan sebanyak 1 mL larutan NaCl 1 M, MgCl₂ 1M dan CaCl₂ 1M untuk memperoleh suspensi bentonit.

Isolasi DNA metagenomik

Metode isolasi DNA dengan memanfaatkan susu skim dan silikat bentonit tersuspensi NaCl 1M, MgCl₂ 1 M, dan CaCl₂ 1 M dikerjakan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Wirajana *et al.*, (2012); Eryatma (2012); Wirajana *et al.*, (2013); Permana (2013). Suspensi bentonit dalam air (aqua DM steril) dilakukan sebagai kontrol.

Isolasi DNA metagenomik modifikasi

Sebanyak 5,6570 gram (sekitar 5 mL) tanah hutan mangrove dimasukkan ke dalam tabung 14 mL ditambah 5mL buffer lisis dan 1,5 mL suspensi susu skim steril. Suspensi divorteks hingga homogen selama 3 menit dan disimpan ke dalam *freezer* sekitar suhu -20°C-10°C selama 15 menit. Suspensi di atas dipanaskan pada suhu 80°C-85°C selama 15 menit, didinginkan pada

suhu kamar, kemudian disentrifugasi 10.000 x g selama 1 menit.

Supernatan diambil sebanyak 1000 μ L dan ditambahi 200 μ L suspensi bentonit kemudian digoyangkan menggunakan *shaker* pada kecepatan 200 rpm selama 180 menit pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 15 menit, supernatan yang diperoleh dianalisis (diharapkan diperoleh pelet bentonit-DNA). Pelet dicuci dengan etanol 70% sebanyak 1 mL, divorteks selama 30 detik, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 x g, kemudian supernatan dibuang. Pelet ditambah 50 μ L buffer TE, divorteks selama 30 detik, disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 15 menit. Supernatan dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung mikro steril baru (larutan yang diperoleh ini merupakan DNA metagenomik). DNA metagenomik hasil isolasi kemudian dianalisis dengan spektrofotometer nano dan elektroforesis gel agarosa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lisis dilakukan secara langsung pada tanah hutan mangrove dengan penambahan suspensi susu skim dan buffer lisis. Buffer lisis berfungsi untuk melisis sel secara kimiawi dan menjaga stabilitas pH. Susu skim ditambahkan sebagai kompetitor adsorpsi DNA dalam tanah. Susu skim diketahui berperan untuk mengurangi adsorpsi dan degradasi asam nukleat dalam tanah (Volossiouk *et al.*, 1995 dan Garcia-Pedrajas *et al.*, 1999).

Kuantitas DNA ditentukan secara semi-kuantitatif dengan mengamati perbandingan ketebalan dan ketajaman pita elektroforegram DNA hasil isolasi terhadap standar. Kualitas DNA ditentukan dari ada tidaknya fragmentasi DNA dari elektroforegram gel agarosa. Elektroforegram gel agarosa dari hasil isolasi DNA metagenomik ditunjukkan pada Gambar 1. Kualitas DNA juga ditentukan berdasarkan rasio absorbansi pada panjang gelombang 230, 260, 280 nm (A_{260}/A_{230} dan A_{260}/A_{280}) dengan spektrofotometer nano. Sedangkan data absorbansi dan rasio absorbansi A_{260}/A_{230} dan A_{260}/A_{280} dapat dilihat pada Tabel 1. Kuantitas DNA ditentukan secara semi-kuantitatif dengan mengamati perbandingan ketebalan dan

ketajaman pita elektroforegram DNA hasil isolasi terhadap standar. Kualitas DNA ditentukan dari ada tidaknya fragmentasi DNA dari elektroforegram gel agarosa. Elektroforegram gel agarosa dari hasil isolasi DNA metagenomik ditunjukkan pada Gambar 1. Kualitas DNA juga ditentukan berdasarkan rasio absorbansi pada panjang gelombang 230, 260, 280 nm (A_{260}/A_{230} dan A_{260}/A_{280}) dengan spektrofotometer nano. Sedangkan data absorbansi dan rasio absorbansi A_{260}/A_{230} dan A_{260}/A_{280} dapat dilihat pada Tabel 1.

Analisis secara semi-kuantitatif dilakukan dengan membandingkan ketebalan pita DNA elektroforegram gel agarosa dari masing-masing perlakuan. Supernatan sebelum elusi pada Na-bentonit memiliki pita DNA yang lebih tebal dibandingkan dengan supernatan sebelum elusi pada Mg-bentonit dan bentonit tersuspensi dalam aqua DM. DNA dari supernatan sebelum elusi pada Ca-bentonit tidak terdeteksi dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil ini mengindikasikan bahwa DNA metagenomik tanah hutan mangrove teradsorpsi paling lemah pada Na-bentonit dibandingkan dengan yang lain, sehingga pita DNA-nya paling tebal (sumur 2 & 3 dalam Gambar 1). Sedangkan DNA metagenomik tanah hutan mangrove teradsorpsi paling kuat dengan Ca-bentonit, bahkan belum mampu terelusi pada elusi pertama yang menyebabkan tidak terdeteksi juga pada elektroforesis gel agarosa (sumur 14 & 15 dalam Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan yang diperoleh Clearly (2012), yang melaporkan bahwa adsorpsi DNA dari *Calf Thymus* (Sigma-Aldrich) menggunakan larutan $CaCl_2$ lebih baik daripada menggunakan $MgCl_2$ dan $NaCl$ untuk ketiga jenis lempung (bentonit, kaolinit dan SiO_2).

Hasil spektrofotometer nano menunjukkan rasio A_{260}/A_{230} dan A_{260}/A_{280} dari hasil isolasi DNA metagenomik sebagian besar masih relatif rendah. Data ini menunjukkan bahwa kontaminan asam humat dan protein dalam DNA metagenomik masih cukup tinggi. DNA metagenomik dari hasil elusi pertama pada bentonit yang tersuspensi aqua DM menunjukkan tingkat kemurnian terhadap protein paling baik (1,82 pada kolom terakhir dalam Tabel 1) karena rasio A_{260}/A_{280} berkisar antara 1,8 dan 2,0. Kisaran rasio ini merupakan indikator tingkat kemurnian DNA terhadap protein yang terbaik (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabel 1. Hasil analisis isolasi dna metagenomik tanah hutan mangrove dengan spektrofotometer Nano pada panjang gelombang 230, 260, dan 280 nm.

Larutan sampel	\bar{A}_{230}	\bar{A}_{260}	\bar{A}_{280}	Rasio $\bar{A}_{260}/\bar{A}_{230}$	Rasio $\bar{A}_{260}/\bar{A}_{280}$
Na-b1	1,060	0,150	0,091	0,14	1,64
Mg-b1	0,567	0,099	0,058	0,17	1,70
Ca-b1	0,341	0,187	0,138	0,55	1,36
A-b1	0,634	0,086	0,047	0,13	1,82
sNa-b1	0,868	0,228	0,169	0,26	1,35
sMg-b1	0,736	0,298	0,235	0,40	1,27
sCa-b1	0,776	0,549	0,440	0,71	1,25
sA-b1	1,242	0,267	0,193	0,22	1,38

Keterangan :

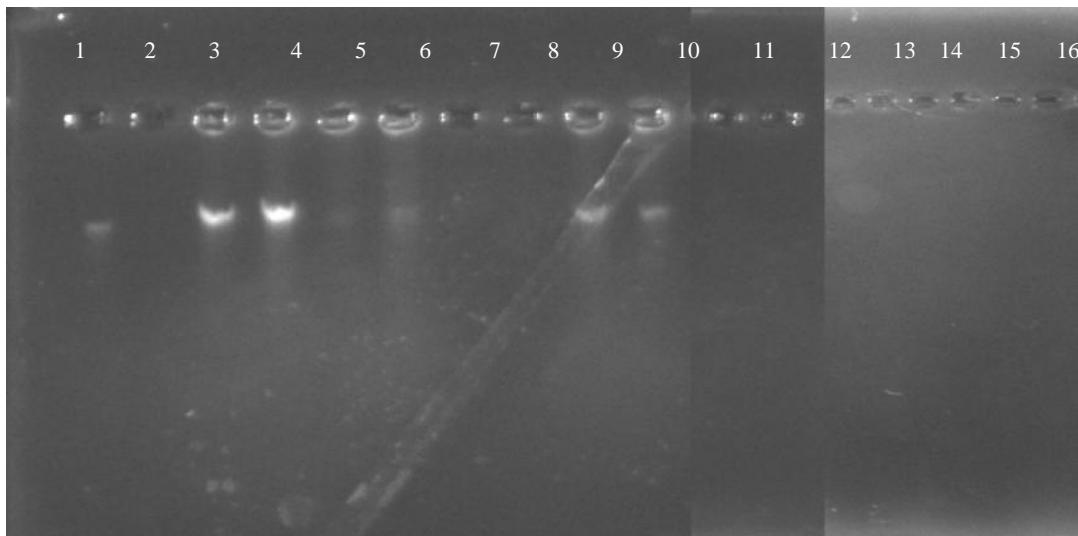
- Na-b1 : hasil elusi I dari Na-bentonit
- Mg-b1 : hasil elusi I dari Mg-bentonit
- Ca-b1 : hasil elusi I dari Ca-bentonit
- A-b1 : hasil elusi I dari bentonit (suspensi air)
- sNa-b : supernatan sebelum elusi dari Na-bentonit
- sMg-b : supernatan sebelum elusi dari Mg-bentonit
- sCa-b : supernatan sebelum elusi dari Ca-bentonit
- sA-b : supernatan sebelum elusi dari bentonit (suspensi air)

Pita DNA paling tebal diperoleh pada supernatan I sebelum elusi dari suspensi Na-bentonit karena Na-bentonit memiliki kemampuan mengembang hingga delapan kali ketika dicelupkan ke dalam air. Na-bentonit tidak memiliki kemampuan adsorpsi yang baik sehingga bentonit ini dikenal sebagai tipe *wyoming* (Na-bentonit – *swelling* bentonit) (PPPTMB, 2002). Maka itu, DNA metagenomik tidak dapat teradsorpsi dengan baik ke dalam Na-bentonit sehingga masih berada dalam supernatan dan tampak paling tebal pitanya pada elektroforegram (Gambar 1) dibandingkan dengan yang lain. Ini sesuai dengan penelitian Clearly, 2012 yang menjelaskan bahwa Na-bentonit hanya dapat mengadsorpsi DNA sekitar 20%, sedangkan Ca-bentonit dan Mg-bentonit berturut-turut dapat mengadsorpsi sekitar 60% dan 70%, sehingga DNA tidak seluruhnya dapat teradsorpsi dalam Na-bentonit.

Pada supernatan sebelum elusi DNA tanah hutan mangrove dengan suspensi Mg-bentonit menunjukkan adanya pita DNA yang relatif tipis. Ini disebabkan karena tipe bentonit ini kurang mengembang apabila dicelupkan ke dalam air dan

tetap terdispersi di dalam air sehingga memiliki sifat adsorpsi yang baik (PPPTMB, 2002). Mg^{2+} berikatan dengan bentonit karena adanya gaya elektrostatis. Adsorpsi Mg-bentonit terhadap DNA terjadi ikatan van Der Waals yang lebih lemah dari Ca-bentonit karena berbentuk *outer-sphere* kompleks dengan fosfat dari DNA dan lempung alami (Nguyen & Elimelech, 2007).

DNA pada supernatan sebelum elusi dan hasil elusi dengan Ca-bentonit tidak terdeteksi dengan elektroforesis gel agarosa. Ada kemungkinan DNA telah teradsorpsi ke dalam Ca-bentonit karena Ca-bentonit memiliki kemampuan adsorpsi yang baik. Berdasarkan penelitian Clearly (2012), Ca-bentonit dapat mengadsorpsi sekitar 60% DNA *Calf Thymus*. Ca^{2+} membentuk *inner-sphere* kompleks dengan punggung fosfat DNA yang dapat menurunkan muatan negatif dan menyebabkan penurunan gaya elektrostatis antara fosfat, sehingga dihasilkan struktur yang kompak pada molekul DNA karena koefisien difusi tinggi (Nguyen & Elimelech, 2007). Apabila diurut berdasarkan kekuatan adsorpsi DNA pada suspensi bentonit maka diperoleh Na-bentonit < Mg-bentonit < Ca-bentonit.



Keterangan :

- Sumur 1 : hasil elusi dari kit
- Sumur 2 : supernatan I (Na-bentonit)
- Sumur 3 : supernatan I (Na-bentonit)
- Sumur 4 : supernatan I (Mg-bentonit)
- Sumur 5 : supernatan I (Mg-bentonit)
- Sumur 6 : supernatan I (Ca-bentonit)
- Sumur 7 : supernatan I (Ca-bentonit)
- Sumur 8 : supernatan I (bentonit)
- Sumur 9 : supernatan I (bentonit)
- Sumur 10 : hasil elusi (Na-bentonit)
- Sumur 11 : hasil elusi (Na-bentonit)
- Sumur 12 : hasil elusi (Mg-bentonit)
- Sumur 13 : hasil elusi (Mg-bentonit)
- Sumur 14 : hasil elusi (Ca-bentonit)
- Sumur 15 : hasil elusi (Ca-bentonit)
- Sumur 16 : hasil elusi (bentonit)
- Sumur 17 : hasil elusi (bentonit)

Gambar 1. Elektroforegram gel agarosa dari hasil isolasi DNA metagenomik

Secara keseluruhan, sedikitnya DNA yang terelusi karena kemungkinan DNA masih terikat dalam Na-bentonit, Mg-bentonit, Ca-bentonit. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Clearly (2012) yang menjelaskan sekitar kurang dari 5%, DNA murni *Calf Thymus* dapat dielusi dari Na-bentonit, Mg-bentonit, Ca-bentonit.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa perbandingan hasil isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove dengan menggunakan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂ menunjukkan bahwa DNA

hanya terdeteksi dengan elektroforesis gel agarosa pada supernatan sebelum elusi dari Na-bentonit dan Mg-bentonit, yang mengindikasikan DNA paling kuat teradsorpsi dengan Ca-bentonit.

Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove dengan tingkat kemurnian yang lebih baik terhadap asam humat dan protein dengan menggunakan silikat bentonit tersuspensi NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂. Hasil penelitian ini menunjukkan perlu dilakukan optimasi elusi DNA dari Na-bentonit, Mg-bentonit dan Ca-bentonit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Ni G.A.A.M. Dwi Adhi Suastuti, M.Si., I Nengah Simpen, S.Si., M.Si., Ketut Ratnayani, S.Si., M.Si., James Sibarani, S.Si., M.Si., Ph.D dan Dra. Ida Ayu Raka Astiti Asih, M.Si. atas semua masukan dalam penulisan naskah ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Kepala dan seluruh staf UPT Laboratorium Forensik Universitas Udayana atas penyediaan tempat dan sarana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Cleary, D. W., 2012, Detection of Microbial Taxa in Complex Communities: impacts of relative abundance, gene transfer and persistence of target DNA, *Thesis*, University of Warwick, the School of Life Sciences, United Kingdom
- Eryatma A. R., 2012, Penggunaan Silika Bentonit dalam Pemurnian DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bali
- Garcia-Pedrajas, M.D., Bainbridge, B.W., Heale, J.B, Perez-Artes E. and Jimenez-Diaz, R.M., 1999, A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* sp. *ciceris* artificial and natural soils, *European Journal of Plant Pathology*, 105 : 251-259
- Handelsman, J., Riesenfeld, C.S., dan Schloss, P.D., 2004, METAGENOMICS: Genomic Analysis of Microbial Communities, *Annu. Rev. Genet.*, 38 : 525–552
- Hoshino, Y. T. and Matsumoto, N., 2005, Skim Milk Drastically Improves the Efficacy of DNA Extraction from Andisol, a Volcanic Ash Soil, *JARQ*, 39 (4) : 247 – 252
- Nguyen, T.H and M. Elimelech, 2007, Plasmid DNA adsorption on silica: Kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts. *Biomacromolecules*, 8 : 24-32
- Permana, C. R. I., 2013, Pengaruh Silika Lempung Terhadap Kemurnian DNA Metagenomik Hasil Isolasi dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Tesis*, Universitas Udayana, Bali
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Mineral dan Batubara (PPPTMB), 2002, Bentonit, <<http://www.tekmira.esdm.go.id/data/Bentonit/ulasan.asp?xid=Bentonit&omId=8&comm=Bentonit>>, diakses tanggal 15 November 2014
- Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA
- Schmeisser, C., Steele, H., and Streit, W.R., 2007, Metagenomics: Biotechnology with Non-Culturable Microbes, *J.Appl Microbiol Biotechnol.*, 75 : 955–962
- Schneegurt, M. A., Dore, S.Y. and Kulpa, C. F., 2003, Direct Extraction of DNA from Soils for Studies in Microbial Ecology, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 5 : 1-8
- Uchiyama, T. and Miyazaki, K., 2009, Functional Metagenomics for Enzyme Discovery: Challenges to Efficient Screening, *J.Biotech*, 20 : 616–622
- Volossiuk, e. T., Jane R., Andross N., 1995, Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms, *Applied Andenvironmental microbiology*, 61 (11) : 3972–3976
- Widiarthi, N. P. F. O., Wirajana, I. N., dan K. Ratnayani, 2014, Pengaruh Penambahan Susu Skim Terhadap Hasil DNA Metagenomik Diisolasi dari Tanah

- Hutan Mangrove, *Jurnal Kimia*, 8 (1) : 17-22
- Wirajana, I. N., Ratnayani, K. dan Yuliana, D. A., 2012, Skrining Selulase dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Jurnal Kimia*, 6 (2) : 191-195
- Wirajana, I N., Ratnayani, K. dan Yuliana, D. A., 2013, Isolasi DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Jurnal Kimia*, 7 (1) : 19-24