

**ISOLASI, AMPLIFIKASI DAN KARAKTERISASI GEN *pef* *Salmonella*
typhimurium DAN GEN *fim-C* *Escherichia coli***

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh Gelar Sarjana Sains**



**Winda Sofihan
3325120252**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2017



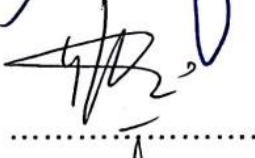

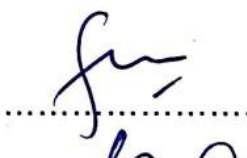


LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI, AMPLIFIKASI DAN KARAKTERISASI GEN *pef Salmonella*

typhimurium DAN GEN *fim-C Escherichia coli*

Nama : Winda Sofihan

No. Reg : 3325120252

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan : <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		16/02/2017
Wakil Penanggung Jawab Pembantu Dekan I : <u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		16/02/2017
Ketua : <u>Dr. Yusmaniar, M.Si</u> NIP. 19620626 199602 2 001		19/02/2017
Sekretaris : <u>Drs. Suhartono, M.Kes</u> NIP. 19550712 198303 1 001		19/02/2017
Anggota Penguji : <u>Dr. Fera Kurniadewi, M.Si</u> NIP. 19761231 200112 2 002		13/02/2017
Pembimbing I : <u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		14/02/2017
Pembimbing II : <u>Irma Ratna Kartika, M.Sc.Tech</u> NIP. 19721204 200501 2 001		15/02/2017

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 9 Februari 2017



LEMBAR PERSEMBAHAN



Alhamdulillahirabbil'alamin...

Akhirnya aku bisa menyelesaikan apa yang sudah aku mulai...



Puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan anugerah sehingga saya bisa menyelesaikan karya sederhana ini dengan baik. Bangga sekali rasanya bisa mempersembahkan karya ini untuk kedua orangtuaku tersayang, Ayahanda Dadang Sopihan dan Ibu Nurhayati, terima kasih telah memberikan cinta dan kasih sayang yang tulus selama 22 tahun terakhir ini. Semoga anakmu ini bisa memberi banyak manfaat untuk orang-orang disekitarnya. Aamiin...

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan” (QS Asy-Syarah: 5-6)

Saya sadar bahwa semua hal yang kita dapatkan tidak lepas dari peran orang lain. Dibalik setiap kesulitan, Allah pasti memberikan jalan serta kemudahan dengan cara yang tidak disangka-sangka. Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada orang-orang yang terlibat selama pembuatan karya ini.

Ibu Muktiningsih, terima kasih atas kesempatan dan kepercayaan yang telah diberikan kepada saya untuk mengerjakan project penelitian ini. Terima kasih pula untuk bimbingan, arahan, dukungan moril maupun materil yang telah Ibu berikan kepada saya sehingga dapat memotivasi saya untuk belajar lebih banyak lagi. Ada kalanya tindakan dan perbuatan saya membuat Ibu sedih, marah atau mungkin kecewa, maka dari itu dari lubuk hati yang paling dalam saya mohon maaf atas segala salah dan khilaf yang pernah saya lakukan. Semoga Ibu senantiasa diberikan kesehatan oleh Allah, dipanjangkan umurnya, diberikan rezeki yang berkah, serta dibalas kebaikannya oleh Allah dengan balasan terbaik-Nya. Aamiin...

Ibu Irma Ratna Kartika, terima kasih atas pelajaran dan pengalaman hidup yang telah Ibu ajarkan kepada saya. Terima kasih pula untuk bimbingan serta dukungan yang Ibu berikan. Bersyukur sekali rasanya bisa kenal dan dekat dengan Ibu. Semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan dan perlindungan kepada Ibu. Aamiin...



Mba Vira Saamia, terima kasih atas bimbingan dan arahnya selama saya penelitian di Puslabfor. Terima kasih pula saya ucapkan kepada rekan-rekan di Subbidang Biologi Molekular Forensik, Puslabfor, Bareskrim Polri, kepada Pak Made, Pak Irvan, Pak Sandy, Mba Beta, Mba Rani, Mba Ana dan Bu ii, terima kasih atas fasilitas yang telah diberikan selama 5 bulan penelitian, sungguh sebuah pengalaman yang sangat berharga bagi saya bisa berkesempatan melakukan penelitian disana.

Dini Nurkhasanah, terima kasih telah menjadi *best partner in research*, walaupun kita berdua sering berbeda pendapat dan adu argument, tapi kita selalu dapat mengambil jalan tengah dari dua pilihan yang ada. Terima kasih pula atas kebersamaannya selama 1 tahun menjalani penelitian yang telah banyak menghadirkan canda, tawa, duka, suka, tangis, haru, bahagia dan kecewa. *See you on top, Din!*

Tim Salmonella 2012, Nurasih, Dwi, Dian dan Dini, terima kasih telah mengajarkan arti kerjasama dan kekompakan tim selama ini. Melihat antusiasme kalian belajar dan penelitian di Lab, menambah semangat dan motivasi ku untuk terus membaca referensi dari berbagai jurnal penelitian. Semoga kita menuai sukses di masa depan ya!

Belum Ada Judul, Friday, Elfri, Oci dan Henni, terima kasih atas kehadiran kalian yang selalu memberikan motivasi dan semangat agar diri ini menjadi pribadi yang lebih baik lagi. Tanpa kalian, aku mungkin tak akan mampu bertahan sejauh ini. Semoga tali ukhuwah kita akan tetap terjalin hingga jannah-Nya. Aamiin...

Teman-teman di grup Pancasila (pejuang mahasiswa semester seratus lima), Afifah, Baha, Fannisa, Friday, Shirley, Dian, Dwi, Dini, Nurasih, Ratih, Vidya, Ipeh, Djoko, Yafie dan Tanti. Satu semester tambahan dari waktu studi normal menjadikanku belajar memahami karakteristik pribadi dari masing-masing. Bersyukur sekali rasanya dapat dipersatukan dengan kalian. Tetap semangat, *guys!*

Tim Salmonella 2013, Yuki, Nurjay, Ilma, Delia, Geta dan Anis, terima kasih atas dukungan dan semangat dari kalian selama ini, selamat meneruskan perjuangan tim Salmonella 2012. *Keep struggle and strong!*

Saudara dan kerabat di Kebon Jeruk, nenek, Mpo Meri, Bang Iwan, Aji, Cica, Mpo Mamut, Bang Kibin, Apri, Tyas, Mpo Iyos, Bang Encok, terima kasih atas kesediaannya menampungku selama satu tahun kuliah

terakhir, terima kasih atas kemudahan fasilitas internet yang telah diberikan. Semoga Allah membalas kebaikan kalian semua, aamiin...

Keluarga Forum PKM UNJ, Bu Vera Maya Santi, Bu Ririn, Mba Nada, Selly, Ka Hana, Husni, Ali, Friska, Niken, Dayat, dan teman-teman KPM UNJ yang tidak disebutkan satu-persatu, senang sekali rasanya bisa turut serta menjadi bagian dari kepanitiaan PIM UNJ, semoga kerja keras kita selama ini bisa turut memberikan kontribusi nyata bagi kemajuan PKM di UNJ. *UNJ Goes To PIMNAS!*

KI Rangers, Afifah, Asiah, Friday, Oci, Ratih, Nurul, Vera, Uyung, Maryanti, Linggar, Zaini, Kanza, Adit dan Rafly, menjadi koordinator di sebuah kepanitiaan besar seperti Kunjungan Industri menjadi sebuah pengalaman yang sangat berarti dalam hidupku, apalagi aku punya kalian yang selalu siap untuk mensukseskan acara ini. Terima kasih atas *unforgettable moment* dan perjuangan kalian, *guys!*

Keluarga Kece P2KA BEMJ Kimia, Mei, Ade, Esi, Cici, Yulia, Yafie, Rika, Ulfa, Ka Gina, Ka Umar, Ka Ipeh, Ka Affif, Ka Gilang, Ka Yokhe dan Ka Oni, dari kalian lah aku termotivasi untuk unggul dalam bidang ilmiah maupun akademik. Terima kasih atas cerita yang pernah terukir diantara kita. *Salam kece P2KA!*

Terima kasih untuk adik angkatku di kampus, Nopa, Geta dan Ratih, perhatian dan wujud kasih sayang yang kalian berikan kepadaku sangat unik sekali. *Terima kasih untuk bunga nya.* Juga untuk Yuki dan Nurjay, maafkan diri ini yang belum bisa menjadi contoh yang baik untuk kalian. *Ambil yang baik-baik, dan perbaiki yang buruknya.*

“Aku tidak punya apa-apa untuk dibanggakan, aku juga tidak punya ilmu untuk diwariskan, tapi aku punya semangat yang harus dipertahankan”
(WS)

Jakarta, Februari 2017

Winda Sofihan

ABSTRAK

WINDA SOFIHAN. 3325120252. Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *pef* *Salmonella typhimurium* dan Gen *fim-C* *Escherichia coli*. Skripsi. Jakarta : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta. 2017.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA dari bakteri *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium*) dan *Escherichia coli* (*E.coli*). Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermoscientific). DNA *S.typhimurium* dan *E.coli* berhasil diisolasi dan diperoleh jumlah DNA total masing-masing sebesar 5816 ng dan 3002 ng dengan rendemen sebesar 46,53% dan 24,02%. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* 56°C selama 30 detik dan tahap ekstensi 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi DNA dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi berdasarkan pola pita DNA yang terbentuk. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa primer *S. typhimurium* mampu mengamplifikasi fragmen gen *pef* *S. typhimurium* dengan panjang ampikon 139 pb, sedangkan primer *E. coli* mampu mengamplifikasi fragmen gen *fim-C* *E.coli* dengan panjang ampikon 121 pb.

Kata kunci: Isolasi DNA; Amplifikasi DNA

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya yang telah memberi ridho, inayah, dan hidayah kepada penulis sehingga Skripsi yang berjudul "**Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *pef* *Salmonella typhimurium* dan Gen *fim-C* *Escherichia coli***" dapat terselesaikan dengan baik.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak pihak yang membantu serta mendukung penulis, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Muktiningsih Nurjayadi, M.Si dan Irma Ratna Kartika, M.Sc.Tech selaku dosen pembimbing I dan dosen pembimbing II.
2. Vira Saamia, S.Si, M.Biomed selaku pembimbing lapangan di Pusat Laboratorium Forensik, Bareskrim Polri.
3. I Made Wiranatha, S.Si selaku Kepala Subbidang Biologi Molekuler, Pusat Laboratorium Forensik, Bareskrim Polri.
4. Dr. Yusmaniar, M.Si selaku Koordinator Program Studi Kimia dan dosen Pembimbing Akademik.
5. Tim Salmonella UNJ 2012 dan 2013.
6. Orang tua yang senantiasa memberikan doa dan dukungannya.

Penulis telah berupaya semaksimal mungkin baik dari segi tenaga maupun pikiran untuk menyelesaikan skripsi ini. Namun alangkah baiknya jika kritik dan saran dari pembaca turut disampaikan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga kehadiran skripsi ini dapat ikut menyumbangkan khasanah ilmu pengetahuan terutama di bidang biokimia yang bermanfaat sebagai media pembelajaran bagi kita semua. Amin.

Jakarta, Februari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	HALAMAN
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL	vi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Identifikasi Masalah.....	3
C. Pembatasan Masalah	4
D. Perumusan Masalah	4
E. Tujuan Penelitian	4
F. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II KAJIAN PUSTAKA	6
A. Isolasi DNA	6
B. <i>Salmonella typhimurium</i>	13
C. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	17
D. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	18
E. Elektroforesis Gel Agarosa	24
F. Gen <i>pef S.typhimurium</i> dan gen <i>fim-C E. coli</i>	29
G. Rancangan Primer	32
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	38
A. Tujuan Operasional Penelitian	38

HALAMAN

B. Tempat dan Waktu Penelitian	38
C. Metode Penelitian	38
D. Alat dan Bahan	39
1. Alat	39
2. Bahan	39
E. Prosedur Kerja	40
1. Pembiakan Bakteri.....	43
2. Isolasi DNA Bakteri dari Biakan Murni.....	42
3. Perancangan Primer.....	47
4. Amplifikasi DNA Bakteri Hasil Isolasi.....	45
5. Uji Konfirmasi Hasil PCR menggunakan Elektroforesis Gel	46
F. Teknik Pengumpulan Data	46
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	47
A. Pembiakan Bakteri <i>S. typhimurium</i> dan <i>E. coli</i>	49
B. Isolasi DNA Bakteri <i>S. typhimurium</i> dan <i>E.coli</i>	47
C. Perancangan Primer	54
D. Amplifikasi DNA oleh Primer dan Karakterisasinya	57
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	59
A. Kesimpulan	60
B. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	66

DAFTAR GAMBAR

	HALAMAN
Gambar 1. Komponen Penyusun Nukleotida pada DNA	6
Gambar 2. Basa Pirimidin dan Basa Purin.....	7
Gambar 3. Pasangan Basa Nitrogen	8
Gambar 4. Ikatan Fosfodiester Antara Nukleotida	8
Gambar 5. Metode Pemurnian DNA Berdasarkan Spin Kolom.....	9
Gambar 6. Struktur Molekul SDS	10
Gambar 7. Ekstraksi DNA dengan Presipitasi Etanol	11
Gambar 8. Pemurnian DNA Berbasis Spin Kolom	12
Gambar 9. Bakteri <i>Salmonella typhimurium</i>	14
Gambar 10. Struktur Umum Lipopolisakarida	15
Gambar 11. Bakteri <i>Escherichia coli</i> O157:H7	18
Gambar 12. Skema Diagram PCR	20
Gambar 13. Denaturasi DNA	21
Gambar 14. Penempelan Primer pada Untai DNA Tunggal	22
Gambar 15. Tahap Perpanjangan Primer	23
Gambar 16. Arah Migrasi Molekul DNA	25
Gambar 17. Prinsip Elektroforesis	26
Gambar 18. Struktur Etidium Bromida	27
Gambar 19. Etidium Bromida sebagai <i>Interchelate Agent</i>	28
Gambar 20. Elektroforegram Hasil Visualisasi Gel Agarosa	39

HALAMAN

Gambar 21. Urutan Nukleotida Gen <i>pef</i> <i>S. typhimurium</i>	30
Gambar 22. Urutan Nukleotida Gen <i>fim-C</i> <i>E. coli</i>	32
Gambar 23. Arah Pergerakan Primer <i>Forward</i> dan Primer <i>Reverse</i>	32
Gambar 24. Kultur Bakteri pada Media LB	47
Gambar 25. Kultur Bakteri pada Media SSA dan Endo Agar	48
Gambar 26. Elektroforegram DNA Bakteri	50
Gambar 27. Elektroforegram DNA Bakteri	57

DAFTAR TABEL

HALAMAN

Tabel 1. Informasi Umum gen <i>pef</i> <i>S. typhimurium</i>	30
Tabel 2. Informasi Umum gen <i>fim-C</i> <i>E. coli</i>	31
Tabel 3. Data Analisis Kuantitatif Hasil Isolasi DNA	53
Tabel 4. Kandidat Pasangan Primer Bakteri <i>S. typhimurium</i>	55
Tabel 5. Kandidat Pasangan Primer Bakteri <i>E. coli</i>	55
Tabel 6. Primer Hasil Sintesis dan Perkiraan Hasil Amplifikasinya	58

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

DNA merupakan materi genetik pembawa sifat pada makhluk hidup. Analisis molekular DNA diawali dengan proses isolasi DNA untuk mendapatkan DNA murni sehingga dapat digunakan untuk analisis molekular selanjutnya seperti PCR. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik biologi molekular yang bertujuan untuk mengamplifikasi atau memperbanyak fragmen-fragmen DNA tertentu. Prinsip dari PCR yaitu meniru proses replikasi DNA pada dogma sentra yang dilakukan oleh enzim tertentu secara *in vitro*.

Salmonella spp. adalah penyebab utama dari penyakit *foodborne disease* (penyakit pada organ pencernaan yang penyebarannya melalui makanan). Tiga serotype utama dari jenis *Salmonella enterica* adalah *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* dan *Salmonella enteritidis*. Selain *Salmonella* spp. analisis literatur menunjukkan terdapat berbagai jenis bakteri *foodborne pathogen* lain yang sudah diidentifikasi, salah satunya yaitu *Escherichia coli* (Crim *et al.*, 2015). Umumnya bakteri ini tidak berbahaya tetapi beberapa strain seperti *E.coli* O157:H7 dapat mengakibatkan keracunan makanan pada manusia.

PCR yang memiliki prinsip kerja dengan cara memperbanyak potongan DNA spesifik dari suatu organisme serta kemampuannya untuk

bekerja pada sampel yang kompleks dengan cepat dan memberikan hasil dengan tingkat akurasi tinggi, menyebabkan PCR memiliki potensi besar untuk diaplikasikan sebagai metode deteksi bakteri *foodborne pathogen* seperti *Salmonella* sp. Namun penggunaan PCR untuk mendeteksi *Salmonella* sp. tersebut harus memperhatikan beberapa hal terutama terkait DNA sampel dan primer yang akan digunakan (Prayoga dan Wardani, 2015).

Penelitian sebelumnya telah ditemukan pasangan primer pada daerah variabel *S. typhi* yang telah berhasil digunakan untuk mengamplifikasi genom *S. typhi* (Muktiningsih dkk, 2009). Hasil uji sensitivitas menunjukkan bahwa kemampuan primer fim-C *S. typhi* [Fw-int2-Rev 1a new] dalam mendeteksi genom *S. typhi* sebagai template sangat tinggi yaitu sampai pada $1,295 \times 10^{-39}$ $\mu\text{g/mL}$, sehingga sangat potensial dijadikan sebagai alat deteksi (Muktiningsih dkk, 2010). Hasil uji klinis terhadap sampel darah pasien demam typhus menunjukkan juga bahwa primer fim-C berukuran 0,2 kilo basa (kb) yang ditemukan mampu mendeteksi keberadaan *S. typhi* pada sampel darah pasien (Kartika dkk, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Muktiningsih (2009) telah berhasil menemukan dan mengungkap fungsi protein fimbrial-C (*fim-C*) *Salmonella typhi* melalui pendekatan proteomik. Protein *fim-C* tersebut berfungsi sebagai alat untuk melekatkan diri pada usus manusia dan terletak pada bagian permukaan. Berdasarkan keberadaannya tersebut

maka protein ini sangat potensial dijadikan target dalam merancang alat deteksi pada tingkat genomik dengan teknik PCR.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Pochop *et al.* (2012) telah berhasil mendeteksi keberadaan bakteri *foodborne pathogen* pada sampel makanan menggunakan primer *pef S. typhimurium*. Gen *pef S. typhimurium* berfungsi sebagai gen yang menengahi pengikatan pada sel epitel usus dan memfasilitasi akumulasi cairan ke dalam ruang luminal. Berdasarkan fungsinya tersebut maka gen ini berperan penting dalam proses patogenesis terhadap sel inang.

Penelitian ini merupakan bagian payung penelitian besar Tim *Salmonella* UNJ yang mengkaji tentang model pengembangan metode deteksi *foodborne pathogen* pada sampel makanan dan pasien. Berdasarkan hasil penelitian dan pengalaman sebelumnya maka tim *Salmonella* UNJ berusaha mengembangkan metode deteksi baru dengan memanfaatkan teknik PCR yang lebih baik yaitu multiplex PCR dan realtime PCR untuk mendeteksi *Salmonella* spp. dan bakteri *foodborne pathogen*.

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikaji, maka masalah yang dapat diidentifikasi adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E.coli*?
2. Bagaimana perancangan primer agar dapat dijadikan sebagai primer yang mengamplifikasi DNA *S. typhimurium* dan *E.coli*?

3. Bagaimana optimasi proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR?
4. Bagaimana uji konfirmasi hasil PCR?
5. Bagaimana mengembangkan metode deteksi *foodborne pathogen* menggunakan teknik PCR?

C. Pembatasan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah yang dikaji, maka penelitian ini dibatasi pada isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*, perancangan primer, amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR serta uji konfirmasi atau karakterisasi hasil PCR.

D. Perumusan Masalah

Berdasarkan pembatasan masalah yang dikaji, maka rumusan masalah yang dapat diambil adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana hasil isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* ?
2. Bagaimana perancangan primer untuk amplifikasi DNA *S. typhimurium* dan *E. coli* ?
3. Bagaimana amplifikasi DNA *S. typhimurium* dan *E. coli* ?
4. Bagaimana hasil karakterisasi amplifikasi DNA *S. typhimurium* dan *E. coli* menggunakan elektroforesis gel agarosa berdasarkan pola pita DNA?

E. Tujuan Penelitian

Secara spesifik, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*, memperoleh informasi tentang

cara merancang primer, memperoleh molekul primer, menghasilkan fragmen gen *pef* *S. typhimurium* dan fragmen gen *fim-C* *E. coli* dan mengetahui hasil konfirmasi PCR.

F. Manfaat Penelitian

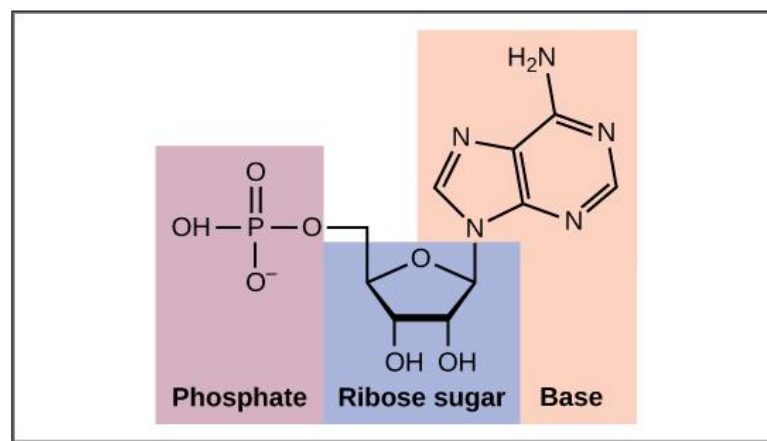
Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan informasi tentang tahapan isolasi DNA bakteri, cara merancang primer, tahapan amplifikasi DNA dengan teknik PCR serta mengembangkan metode deteksi *foodborne phatogen* dengan menggunakan teknik PCR.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Isolasi DNA

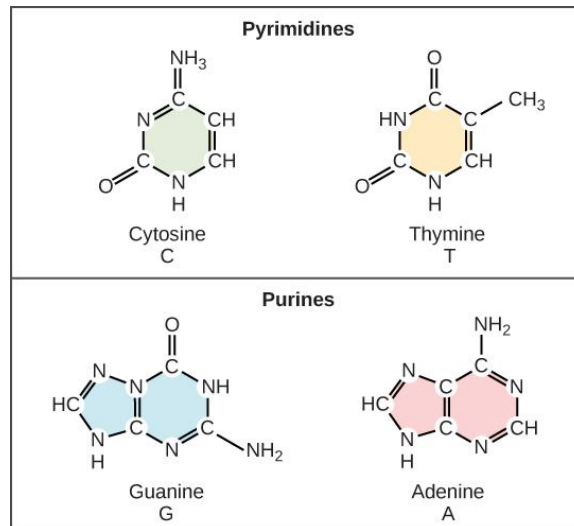
DNA adalah material genetik yang membawa karakteristik/sifat pada makhluk hidup. Unit struktural dari DNA adalah nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen yang terikat pada atom C. Komponen penyusun nukleotida pada DNA ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. Komponen Penyusun Nukleotida pada DNA. Tersusun atas gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (Molecular Biology, 2017).

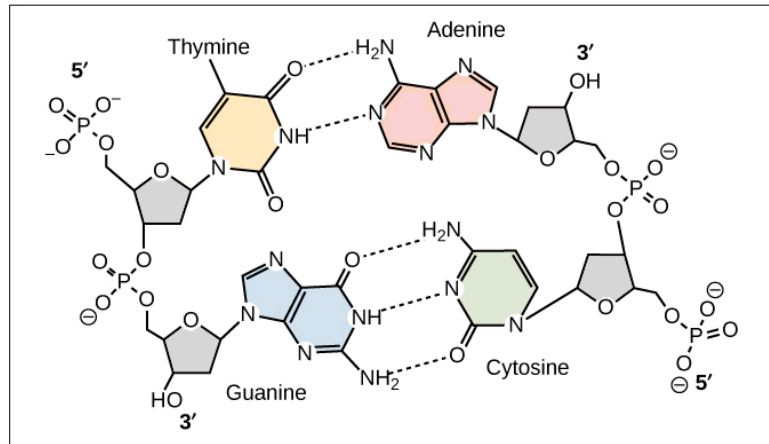
Basa nitrogen pada DNA terdiri atas dua macam yaitu pirimidin dan purin (Gambar 2). Basa purin terdiri atas Adenin (A) dan Guanin (G) yang memiliki struktur cincin ganda sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin tunggal. Adenin berpasangan dengan timin dan guanin berpasangan dengan sitosin (Gambar 3). Pasangan-pasangan basa ini bersifat spesifik karena dihubungkan oleh ikatan hidrogen antara dua untai DNA.

Perpasangan ini didasarkan pada penelitian Chargaff, sehingga disebut dengan aturan Chargaff (Molecular Biology, 2017).



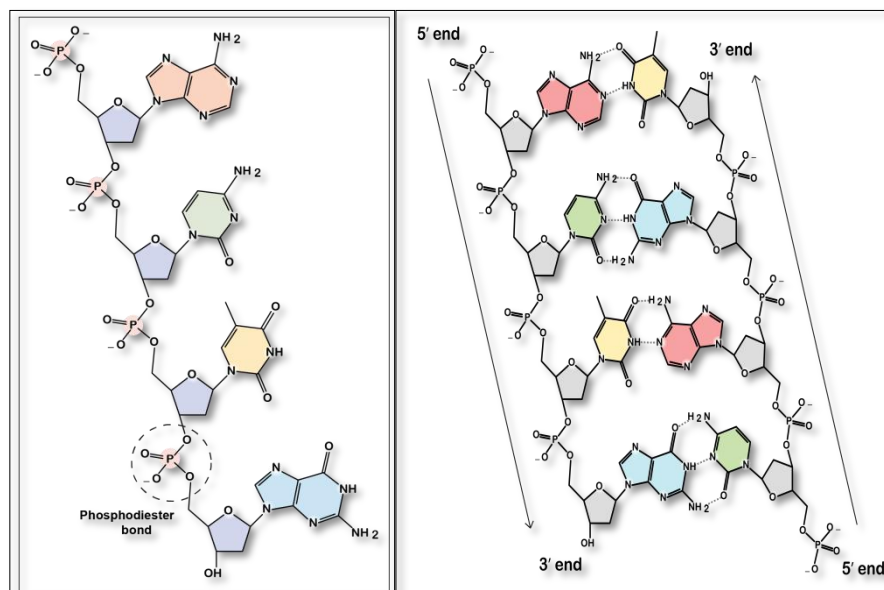
Gambar 2. Basa Pirimidin dan Basa Purin. Basa pirimidin terdiri dari sitosin dan timin, basa purin terdiri dari guanin dan adenin (Molecular Biology, 2017)

Chargaff telah mengisolasi DNA dari beberapa organisme, dan menunjukkan bahwa banyaknya basa purin selalu sama dengan banyaknya basa pirimidin, banyaknya A selalu sama dengan T, dan jumlah G sama dengan jumlah C atau $(A+G)/(T+C)=1$. Jumlah $G+C$ tidak sama dengan $A+T$, atau perbandingan $(G+C)/(A+T)$ tidak sama dengan satu tetapi bervariasi tergantung dari organismenya. Antara basa G dan C dapat terbentuk 3 ikatan hidrogen (kekuatan kira-kira 17 kkal/mol), dan antara A dan T dihubungkan dengan 2 ikatan hidrogen (kekuatan kira-kira 10 kkal/mol), sehingga ikatan antara G-C lebih kuat dibandingkan dengan A-T (Gambar 3). Oleh sebab itu DNA yang banyak mengandung G dan C lebih sulit didenaturasi dibandingkan dengan DNA yang banyak mengandung A dan T (Fessenden dan Fessenden, 1986).



Gambar 3. Pasangan Basa Nitrogen. Adenin Berpasangan dengan Timin, Guanin Berpasangan dengan Sitosin (Khan Academy, 2016).

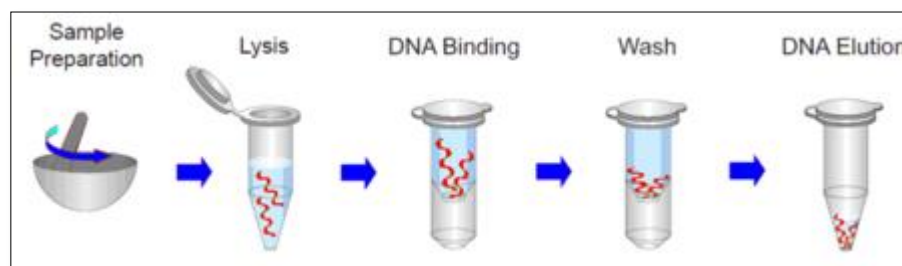
Nukleotida dihubungkan oleh ikatan fosfodiester. Ikatan kovalen yang terbentuk antara ujung 5' gugus fosfat dengan ujung 3' gula deoksiribosa (Gambar 4). Nukleotida pada DNA akan membentuk dua untai yang berpilin seperti pilin ganda (*double helix*). Untai ganda DNA adalah molekul antiparalel yang berarti bahwa dua untai ini berjalan bersama satu sama lain tetapi berlawanan arah.



Gambar 4. Ikatan fosfodiester antara nukleotida. Untai ganda DNA bersifat antiparalel (Khan Academy, 2016)

Isolasi DNA merupakan tahap awal yang harus dikerjakan dalam rekayasa genetika. Prinsip dasar isolasi total DNA/RNA dari jaringan (sel kultur, darah total, bakteri, dan ragi) adalah dengan memecah atau mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA dan RNA. Teknik dasar dalam melakukan isolasi DNA terdapat dua cara yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekulnya dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Adapun prinsip utama dari presipitasi adalah pengendapan DNA agar terpisah dari zat lain.

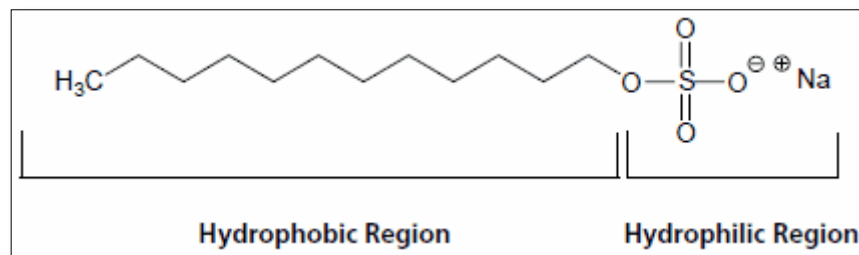
Metode isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara salah satunya yaitu pemurnian DNA berdasarkan spin kolom. Pemurnian DNA berbasis spin kolom merupakan metode ekstraksi fasa padat untuk memurnikan asam nukleat. Asam nukleat akan mengikat fasa padat silika pada kondisi tertentu (Tolosa *et al.*, 2007). Metode pemurnian asam nukleat ini terdiri dari empat tahap yaitu lisis, pengikatan (*bind*), pencucian (*wash*) dan elusi (Gambar 5).



Gambar 5. Metode pemurnian DNA berdasarkan spin kolom. Terdiri dari empat tahap yaitu lisis, *bind*, *wash*, dan elusi (LifeCo Scientific, 2017).

1. Tahap Lisis

Sel sampel akan pecah dengan prosedur lisis. Proses lisis dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan senyawa *sodium dodecyl sulfate* (SDS). SDS merupakan senyawa surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan air (Fessenden dan Fessenden, 1986). SDS dapat menyebabkan hilangnya molekul lipid pada membran sel sehingga struktur membran akan rusak dan melisiskan isi sel (Hutagaol dkk, 2012). Gambar struktur molekul SDS disajikan pada Gambar 6.



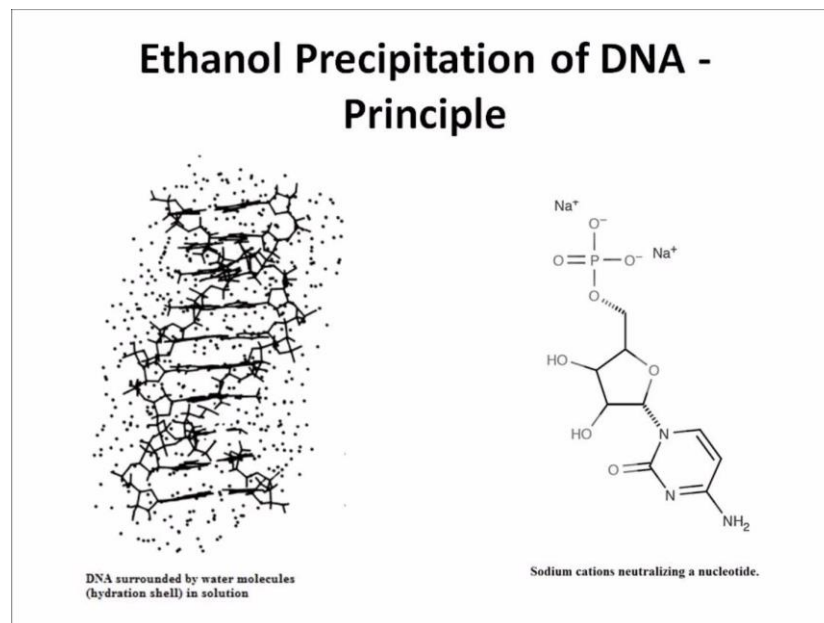
Gambar 6. Struktur molekul SDS. Pada molekul SDS terdapat muatan negatif yang diimbangi oleh gugus positif sehingga bersifat hidrofil dan rantai karbon panjang yang bersifat hidrofob (Vicki, 2008).

Proses lisis juga dilakukan secara enzimatik dengan penambahan Proteinase K Solution. Proteinase K Solution berfungsi memutus ikatan peptida pada asam amino (Donohue and Osna, 2004).

2. Tahap pengikatan (*bind*)

Larutan *buffer* ditambahkan ke dalam sampel dengan penambahan etanol atau isopropanol kemudian akan membentuk *binding solution* dengan DNA. Hal ini disebut juga dengan presipitasi etanol (Gambar 7). Presipitasi etanol merupakan metode pemurnian DNA/RNA dari

fasa air menggunakan etanol sebagai *anti-solvent* (BioResource, 2014). Pengikatan asam nukleat oleh silika juga terjadi pada tahap ini (Gambar 8).



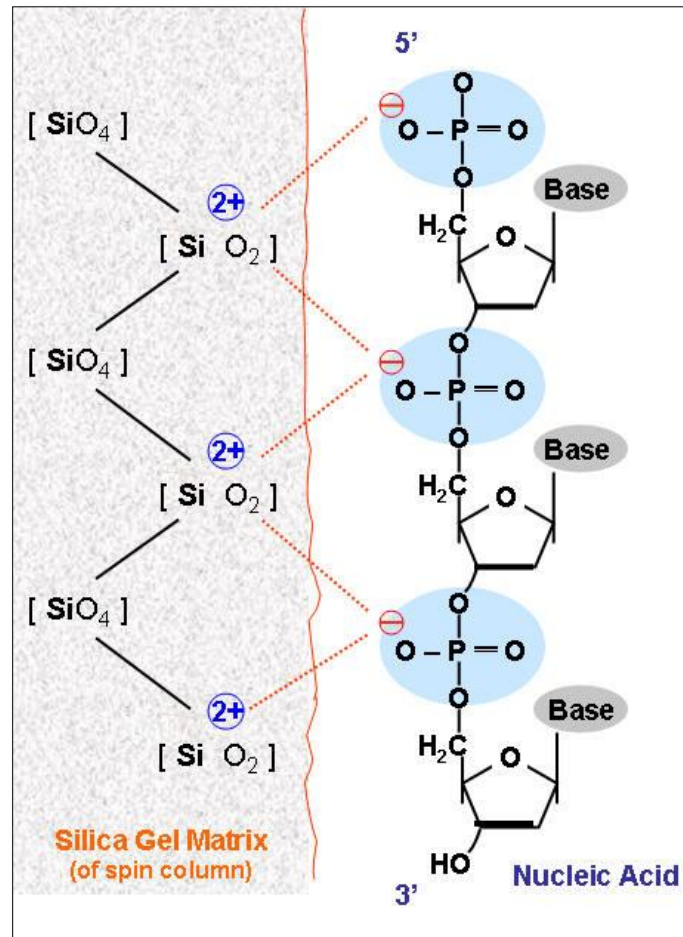
Gambar 7. Ekstraksi DNA dengan presipitasi etanol. Presipitasi dilakukan dengan penambahan garam dan etanol ke dalam larutan yang mengandung DNA/RNA. Kehadiran kation monovalent (Na^+) mengoptimalkan proses presipitasi. Presipitat diperoleh dengan teknik sentrifugasi (BioResource, 2014).

3. Tahap pencucian (*wash*)

Presipitat yang dihasilkan dari tahap sebelumnya kemudian dipindahkan ke dalam kolom (*spin column*). Filtrat dihilangkan dan *wash buffer* ditambahkan ke dalam kolom. Proses pencucian ini menghilangkan kontaminan berupa protein dan debris sel, sehingga hanya asam nukleat yang akan terikat pada membran.

4. Tahap elusi (*elute*)

Tahap elusi dilakukan dengan penambahan *buffer* elusi sehingga larutan DNA akan terkumpul pada dasar tabung.



Gambar 8. Pemurnian DNA berbasis spin kolom. Silika pada kolom akan mengikat gugus fosfat pada asam nukleat (Scmid, 2003).

DNA yang diisolasi dari jaringan yang berlainan dari suatu organisme mengandung proporsi basa yang berbeda bergantung pada jenis organismenya. Misalnya, jaringan manusia mengandung 20% sitosin (C), 20% guanin (G), 30% adenin (A) dan 30% timin (T). Sedangkan pada organisme lain seperti *E. coli* mengandung 25% sitosin (C), 25% guanin (G), 25% adenin (A) dan 25% timin (T) (Fessenden dan Fessenden, 1986).

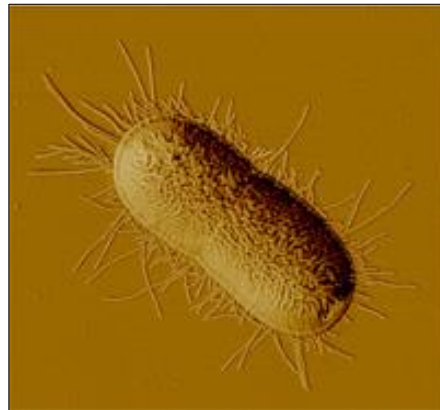
B. *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium (*S. typhimurium*) merupakan bakteri gram negatif yang memiliki karakteristik antara lain bersifat patogen, tidak membentuk spora dan bergerak dengan flagella. Sel bakteri *S. typhimurium* berbentuk batang berukuran 1-1,5 µm. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein dan lipopolisakarida (LPS). Bakteri *S. typhimurium* juga memiliki filli atau *fimbriae* diseluruh permukaan tubuh. Filli tersusun atas unit protein yang disebut *pillin*, mempunyai struktur yang berbentuk pipa, mempunyai peran dalam proses konjugasi, sebagai reseptor bagi bakteriofag dan berperan pula dalam proses pelekatan (*adhesi*) antara bakteri dengan permukaan sel inang. Sel inang utama dari *S. typhimurium* adalah usus hewan dan manusia, tetapi secara alami dapat hidup di air, tanah dan beberapa tanaman pangan. Bakteri ini dapat bertahan hidup beberapa minggu dalam air (kurang lebih 4 minggu) dan beberapa tahun dalam tanah apabila kondisinya memungkinkan (Mortimer *et al.*, 1981). Gambar bakteri *S. typhimurium* disajikan pada Gambar 9.

Berdasarkan pada kebutuhan oksigennya bakteri *S. typhimurium* bersifat fakultatif anaerob. Bakteri ini membutuhkan suhu optimal 37°C untuk pertumbuhannya, dapat memfermentasikan D-glukosa menghasilkan asam dan dapat menghasilkan H₂S yang merupakan produk hasil reduksi dari asam amino yang mengandung sulfur. Strain bakteri *S. typhimurium* termasuk anggota familia *enterobacteriaceae* yang

bersifat tidak memfermentasikan laktosa dan sukrosa. Berikut taksonomi dari bakteri *S. typhimurium*.

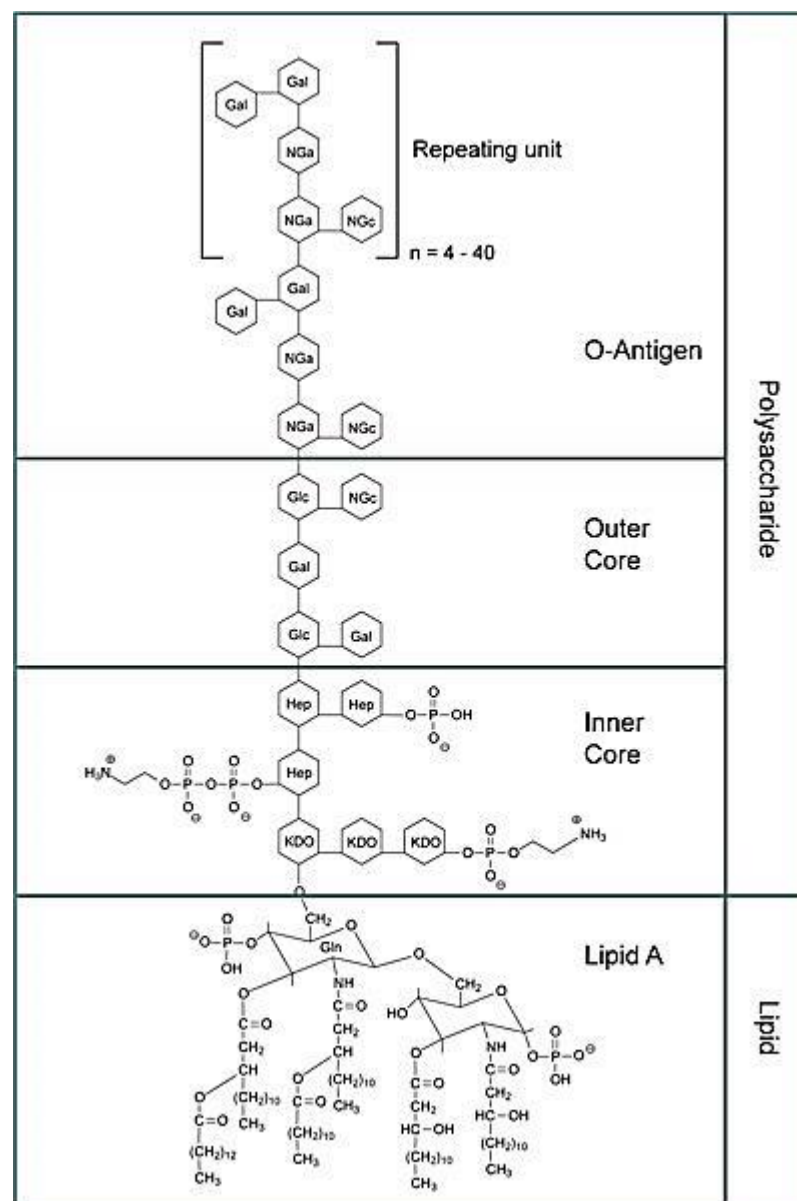
Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Proteobacteria*
Class : *Gammaproteobacteria*
Ordo : *Eubacteriales*
Family : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Salmonella*
Species : *Salmonella enterica*
Serotype : *typhimurium*



Gambar 9. Bakteri *Salmonella typhimurium*. Bakteri *S. typhimurium* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, anaerob fakultatif, bergerak dengan flagella (Damianus, 2008).

Bakteri *S. typhimurium* mempunyai antigen O atau antigen somatik yang merupakan komponen utama lipopolisakarida (LPS) pada membran luar. Gambar struktur lipopolisakarida yang terikat pada peptidoglikan disajikan pada Gambar 10. LPS terdiri dari antigen O, oligosakarida inti, dan lipid A, yang menghubungkan LPS dengan membran luar.

Oligosakarida inti adalah oligosakarida inti yang terikat dengan lipid A melalui 2-keto-3-deoksioktanoat. Lipid A adalah glikolipid yang bertanggung jawab atas aktivitas endotoksin (bersifat racun) LPS. Rantai spesifik-O atau rantai sisi O adalah bagian imunodominan dari molekul LPS di sel bakteri.



Gambar 10. Struktur Umum Lipopolisakarida. Keterangan KDO: 3-deoxy- α -D-mannoctulosonic acid, Hep: Heptulose (ketoheptose), NGa: Galactosamine, NGc: Glucosamine (Sigma, 2017).

Struktur LPS ini sangat penting karena secara alami pengulangan unit-unit gula dari rantai-rantai membran luar polisakarida berperan pada spesifisitas antigen-O yang juga membantu penentuan virulensi organisme, melindungi organisme untuk melawan infeksi atau dapat membuat bakteri tersebut mematikan, dan adanya komponen endotoksin pada dinding sel berperan dalam patogenesis bakteri tersebut, karena membantu terjadinya inflamasi lokal pada jaringan tempat bakteri tersebut berkembang biak. Secara umum susunan dinding sel *S. typhimurium* terdiri atas membran luar, ruang periplasmik dan membran plasma. Membran luar terdiri atas lipoprotein, lipopolisakarida (LPS), dan fosfolipid. Ruang periplasmik merupakan ruang antara membran luar dan membran plasma, tersusun dari peptidoglikan yang mengandung *N-asetilglukosamin* (NAG) dan *N-asetilmurat acid* (NAM). Peptidoglikan ini bisa rusak dengan adanya enzim *lysozyme*. Sedangkan membran plasma yang tersusun dari protein dan fosfolipid dapat dirusak dengan adanya alkohol atau deterjen spesifik (Todar, 2012).

Proses pathogenesis bakteri *S.typhimurium* diawali mulai dari konsumsi makanan yang terkontaminasi dengan feses yang terdapat bakteri *S.typhimurium* dari organisme pembawa (*host*). Setelah masuk dalam saluran pencernaan, *S.typhimurium* menyerang dinding usus yang menyebabkan kerusakan dan peradangan. Infeksi dapat menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah karena dapat menembus dinding usus hingga ke organ lain seperti paru-paru, limpa, tulang-tulang sendi, serta

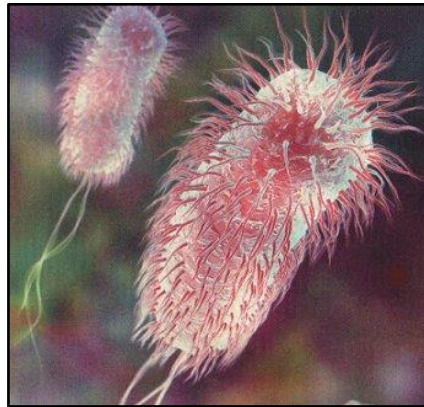
plasenta dan dapat menembusnya sehingga menyerang fetus pada wanita atau hewan betina yang hamil. Selain itu juga dapat menembus membran yang menyelubungi otak.

Substansi racun yang diproduksi oleh bakteri ini dapat mempengaruhi keseimbangan tubuh. Di dalam hewan atau manusia yang terinfeksi *S.typhimurium*, pada fekesnya terdapat kumpulan *S.typhimurium* yang bisa bertahan sampai berminggu-minggu atau bahkan berbulan-bulan. Bakteri ini tahan terhadap temperatur yang panas sehingga dapat bertahan hidup berbulan-bulan dalam tanah atau air.

C. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bakteri gram negatif yang memiliki karakteristik tidak membentuk spora, motil, bersifat fakultatif anaerob dan berbentuk batang berukuran panjang 0,5-2 μm . Bakteri *E.coli* dapat memfermentasikan laktosa pada media MacConkey Agar dan menghasilkan koloni hijau keperakan pada media Endo Agar akibat proses metabolisme laktosa yang menghasilkan aldehid yang berupa kristal *fuchsin* (Lubis, 2015).

Bakteri *E.coli* banyak terdapat pada usus manusia. Umumnya bakteri ini tidak berbahaya tetapi beberapa strain seperti *E. coli* O157:H7 dapat mengakibatkan keracunan makanan pada manusia. Bakteri *E. coli* sering digunakan dalam teknologi rekayasa genetika dimana digunakan sebagai vector untuk menyisipkan gen-gen tertentu. Gambar bakteri *Escherichia coli* O157:H7 disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11. Bakteri *Escherichia coli* O157:H7. Merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob (Drew, 2010).

Berikut ini taksonomi dari bakteri *E. coli*

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>

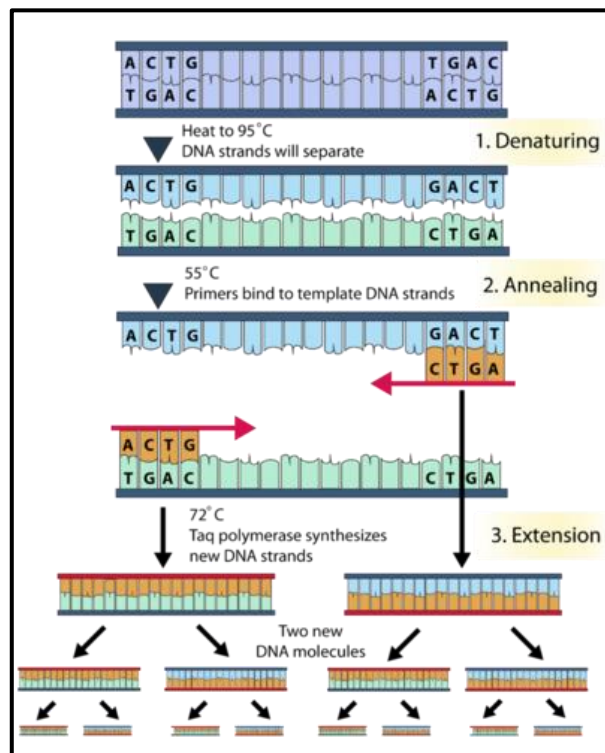
D. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekular yang bertujuan untuk mengamplifikasi atau memperbanyak fragmen-fragmen DNA tertentu. Prinsip dari PCR yaitu meniru proses replikasi DNA pada dogma sentral yang dilakukan oleh enzim tertentu secara *in vitro*. (O'Connell, 2002).

Komponen dan reagen yang diperlukan dalam metode PCR adalah sebagai berikut:

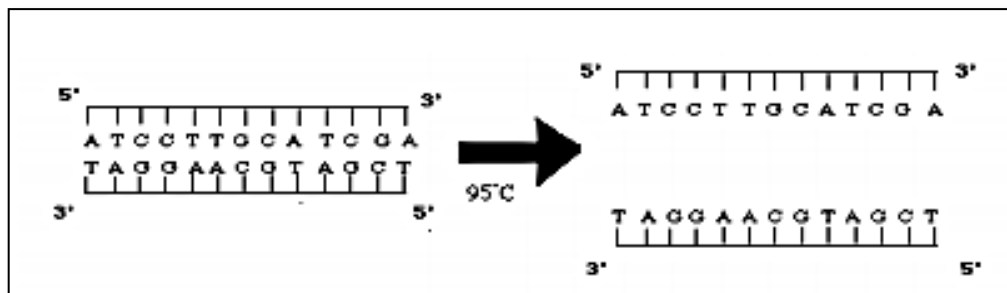
1. *Template* (cetakan) DNA merupakan urutan DNA yang mengandung daerah yang akan diamplifikasi. *Template* dapat mencakup DNA genomik/plasmid DNA dan cDNA (RNA).
2. Sepasang primer yang berperan sebagai titik awal terjadinya amplifikasi DNA. Primer terdiri dari beberapa untai oligonukleotida yang menempel dengan basa komplementer pada untai tunggal cetakan DNA dan membatasi fragmen DNA yang akan diamplifikasi.
3. Enzim *Taq DNA Polymerase* yang berfungsi mengamplifikasi DNA *template*. *Taq DNA Polymerase* DNA yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*) merupakan enzim yang stabil terhadap suhu tinggi.
4. *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs) yang merupakan *building blocks* yang diperlukan DNA polimerase dalam menyintesis untai DNA baru. *Deoxynucleoside triphosphates* terdiri dari dATP (*deoxyadenine triphosphate*), dTTP (*deoxythymidine triphosphate*), dCTP (*deoxycytidine triphosphate*), dan dGTP (*deoxyguanine triphosphate*).
5. *Buffer PCR* yang berfungsi untuk menjaga kestabilan pH selama tahap PCR berlangsung.
6. Kation Mg^{2+} dari $MgCl_2$ yang berperan sebagai kofaktor berfungsi untuk menstimulasi aktivitas enzim DNA polimerase.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu denaturasi DNA *template*, penempelan primer pada templat (*annealing*), pemanjangan untai DNA (*extension*). Tahap PCR merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Proses PCR umumnya berlangsung sebanyak 20-40 siklus. Tiap siklus terdiri atas 3 tahapan. Temperatur dan waktu yang digunakan umumnya disesuaikan dengan berbagai variasi parameter tergantung pada spesies dan panjang fragmen yang akan diamplifikasi. Tahap-tahap dalam proses PCR adalah *initial denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, *final extension*, dan *final hold* (O'Connell, 2002). Skema diagram PCR disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Skema diagram PCR. Menunjukkan bahwa setiap siklus berisi tiga tahap (denaturasi DNA , *annealing* primer ke DNA template, dan perpanjangan DNA), dan menggambarkan sifat eksponensial dari reaksi (Santos *et al.*, 2004).

Tahap *initial denaturation* yaitu pemanasan reaksi pada temperatur diatas 90°C (biasanya pada temperatur 94-96°C) yang berlangsung selama 1-10 menit. Selanjutnya tahap *denaturation*, yaitu tahap awal dalam proses siklus PCR yang merupakan tahap pemanasan pada suhu 94-98°C selama 20-30 detik dan menyebabkan DNA *template* terdenaturasi menjadi untai DNA tunggal (*single strand*) karena terjadinya pemutusan ikatan hidrogen yang terdapat pada untai ganda DNA (Gambar 13). Untai DNA tunggal ini yang menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat.



Gambar 13. Denaturasi DNA. Untai DNA ganda mengalami denaturasi menjadi untai tunggal DNA akibat pemutusan ikatan hydrogen (Innis *et al.*, 1990).

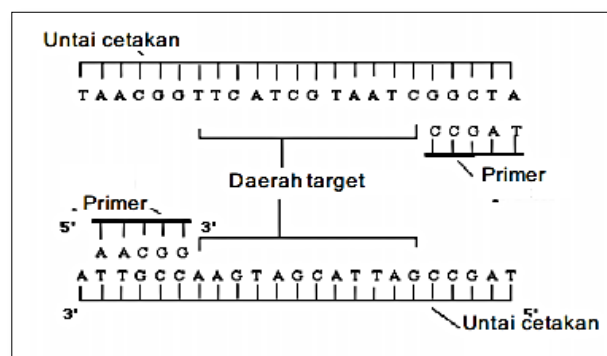
Selanjutnya tahap *annealing* (penempelan) yang berlangsung pada temperatur 50-72°C selama 20-40 detik yaitu penempelan primer pada untai tunggal DNA (Gambar 14). Suhu penempelan primer merupakan kunci dalam menentukan kekhasan reaksi PCR. Penggunaan suhu penempelan primer yang sesuai, memungkinkan masing-masing primer dapat menempel pada kedua ujung DNA cetakan.

Suhu penempelan primer dapat dihitung berdasarkan urutan nukleotida primer yang digunakan. Umumnya suhu penempelan primer

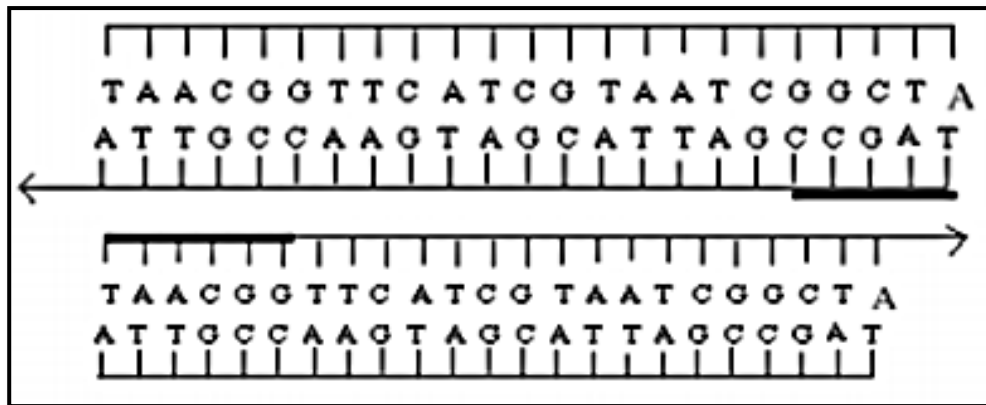
optimum berkisar $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dari suhu perhitungan penempelan primer. Jika suhu penempelan primer terlalu tinggi dari suhu optimum, menyebabkan primer tidak menempel dengan DNA cetakan. Sedangkan, jika suhu penempelan primer terlalu rendah dari suhu penempelan primer optimum menyebabkan *mispriming*, yaitu penempelan primer pada tempat yang salah pada DNA cetakan sehingga dihasilkan produk non spesifik. Oleh karena itu dilakukan optimasi terhadap suhu penempelan primer. Rumus empiris (*rule of the thumb*) yang biasa digunakan untuk memperkirakan T_m (*melting temperature*) (temperatur dimana 50% DNA *template* terdenaturasi menjadi *single strand*) dari primer tersebut adalah sebagai berikut:

$$T_m = [(\text{jumlah A + T}) \times 2^{\circ}\text{C} + (\text{jumlah G + C}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

Temperatur *annealing* kira-kira $3-5^{\circ}\text{C}$ dibawah temperatur T_m . Pembentukan ikatan hidrogen antara primer dan *template* hanya akan terjadi jika urutan primer sangat komplemen dengan urutan *templatnya*. Enzim *Taq* Polimerase akan membentuk ikatan primer-*template hybrid* dan memulai sintesis DNA.



Gambar 14. Penempelan primer pada untai DNA tunggal. Primer akan menempel pada basa komplementer cetakan DNA (Innis *et al.*, 1990).



Gambar 15. Tahap perpanjangan primer. Arah perpanjangan primer dari arah 5' ke 3' (Innis *et al.*, 1990).

Temperatur pada tahap *extension* bergantung pada enzim DNA polimerase yang digunakan yaitu *taq polymerase* yang mempunyai aktivitas optimum pada temperatur 75-80°C, dan umumnya digunakan temperatur 72°C (Innis *et al.*, 1990). Enzim DNA polimerase mensintesis untai DNA baru yang komplemen dengan DNA *template* dengan penambahan dNTP dari arah 5' ke 3' pada tahap *elongation* (Gambar 15). Saat kondisi normal pada tahap *extension/elongation*, sejumlah DNA target akan dilipat gandakan, sehingga menghasilkan jumlah yang berlipat secara eksponensial. Produk hasil akhir amplifikasi (disebut *amplicon* dan berupa DNA untai ganda) tersebut dapat dirumuskan sebagai $(2^n - 2n)x$, dimana n adalah jumlah siklus; $2n$ adalah hasil pertama yang diperoleh setelah siklus pertama dan hasil kedua yang diperoleh setelah siklus kedua dengan panjang tidak tertentu; dan x adalah jumlah *copy* (jumlah molekul) DNA *template*. Tahap *final extension* diperlukan untuk memastikan bahwa setiap molekul untai tunggal DNA sudah diperpanjang

secara utuh. Tahap ini berlangsung pada suhu 70-74°C selama 5-15 menit setelah siklus terakhir PCR. Sementara tahap *final hold* berlangsung pada suhu 4-15°C, dengan waktu yang tidak ditentukan. Umumnya tahap ini hanya bersifat tambahan, seperti reaksi PCR akan dilakukan semalaman atau disimpan dalam waktu yang singkat, sebelum dilakukan tahap eksperimen berikutnya.

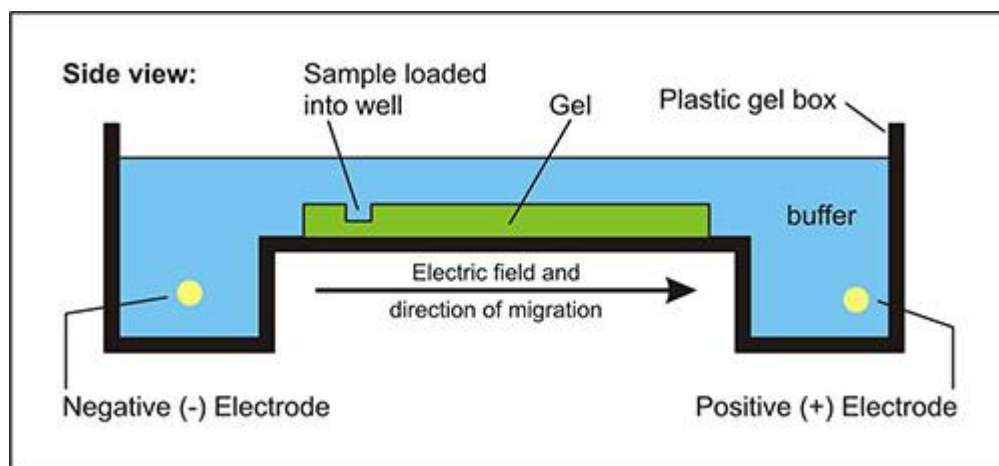
E. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Prinsip dasar teknik ini yaitu pemisahan molekul DNA, RNA, atau protein oleh medan listrik berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik didalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrometer massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau *immuno-blotting* yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut (Radji *et al.*, 2010).

Pemisahan protein atau asam nukleat berukuran kecil (DNA, RNA, atau oligonukleotida) biasanya menggunakan gel yang merupakan gel poliakrilamida yang dibuat dengan konsentrasi berbeda-beda antara akrilamida dan zat yang memungkinkan pertautan silang (*cross-linker*) sehingga menghasilkan jaringan poliakrilamida dengan ukuran rongga

atau pori yang berbeda-beda. Pemisahan DNA yang lebih besar (lebih dari beberapa ratus basa), menggunakan gel agarosa.

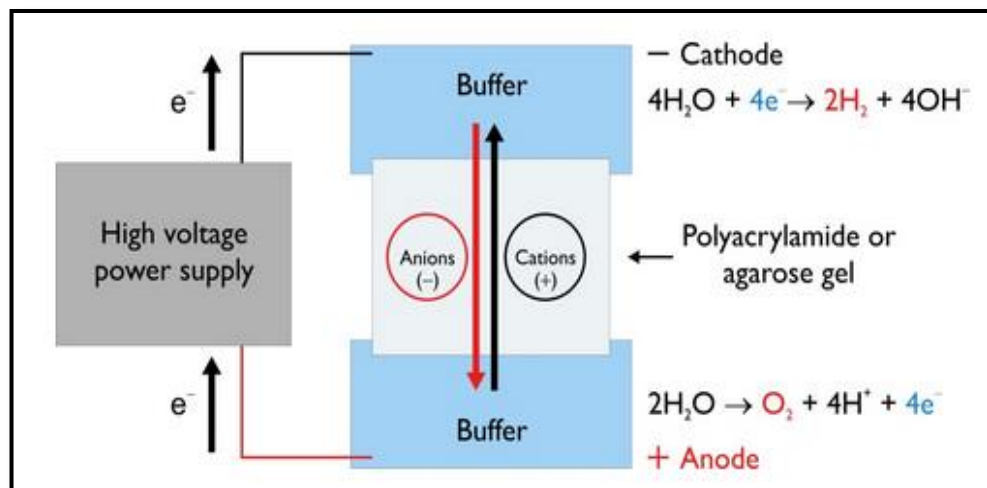
Sampel molekul dalam proses elektroforesis ditempatkan dalam sumur (*well*) pada gel dalam larutan penyangga (yaitu buffer Tris Asetat EDTA) dan dialirkan listrik. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Sementara arah DNA yang menuju elektroda positif disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Rangkaian alat elektroforesis gel agarosa ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 16. Arah migrasi molekul DNA. Molekul DNA bergerak menuju arah positif dalam matriks gel agarosa (Heerden, 2014).

Prinsip dari elektroforesis seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 17 adalah sebagai berikut: dua elektroda yang direndam dalam larutan *buffer* akan menghasilkan beda potensial saat *power supply* dinyalakan. Elektron akan mengalir dari anoda menuju katoda. Katoda menghasilkan gas hidrogen dan ion hidroksida sedangkan anoda menghasilkan gas oksigen

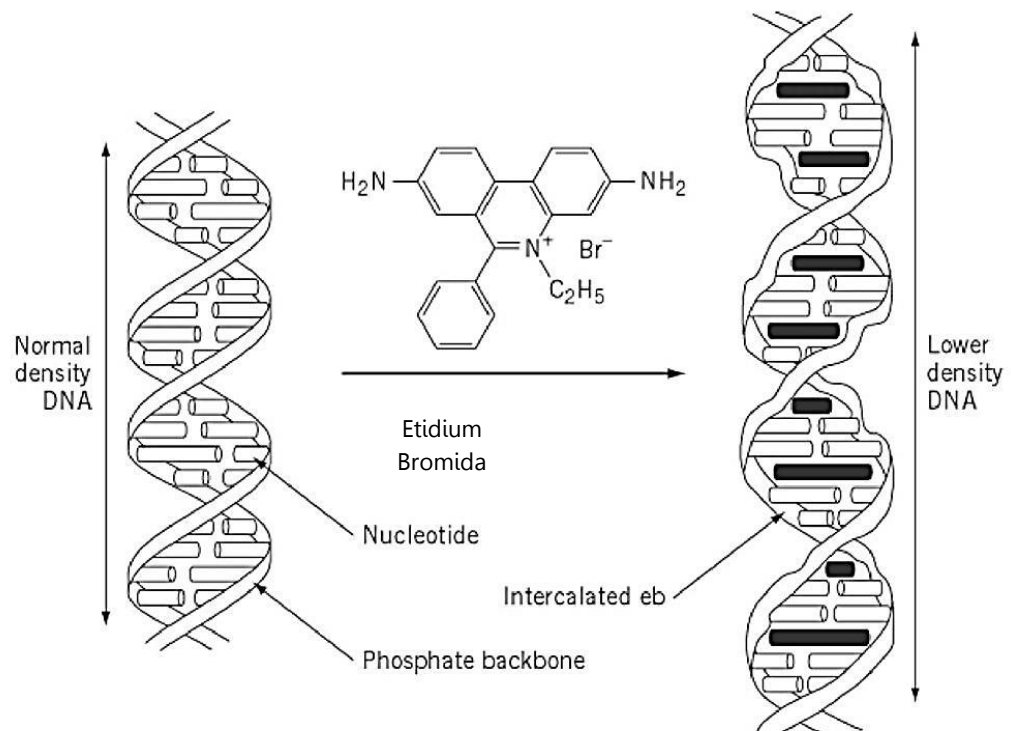
dan proton. Partikel bermuatan dapat bermigrasi karena perbedaan potensial listrik. Ion positif (kation) bergerak ke arah katoda bermuatan negatif sedangkan ion negatif (anion) bergerak menuju anoda bermuatan positif.



Gambar 17. Prinsip elektroforesis. Katoda menghasilkan gas hidrogen dan ion hidroksida sedangkan anoda menghasilkan gas oksigen dan proton (Herden, 2014)

Fragmen DNA yang berukuran lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan fragmen DNA yang berukuran besar sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya. TAE (Tris-Asetat EDTA) 1X, Tris/Borat merupakan *buffer* yang umum digunakan sebagai *buffer* elektroforesis karena memiliki kapasitas *buffering* yang tinggi pada titik isoelektriknya. Tris bertindak sebagai *conducting* ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion H^+ dan OH^- yang dihasilkan oleh elektrode, hal ini berhubungan dengan fungsi *buffer* dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga merubah elektromobilitas DNA.

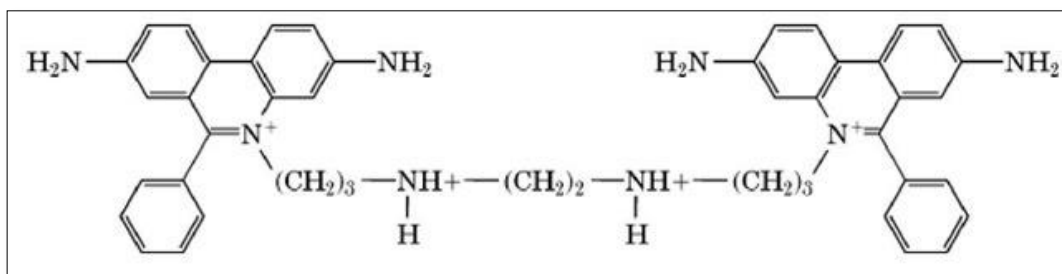
Proses visualisasi melalui proses pewarnaan dengan menambahkan larutan etidium bromida yang akan masuk diantara ikatan hidrogen pada DNA. Etidium bromida dapat mengikat molekul DNA dan menangkap sinar ultraviolet sehingga terjadi pendaran dan pita dapat terlihat di atas sinar ultraviolet. Panjang amplikon dapat diperkirakan dengan cara membandingkannya dengan pita DNA standar. Proses terikatnya Etidium Bromida pada DNA ditunjukkan pada Gambar 18.



Gambar 18. Struktur Etidium Bromida. Etidium bromida menyisip diantara molekul DNA (What When How, 2017).

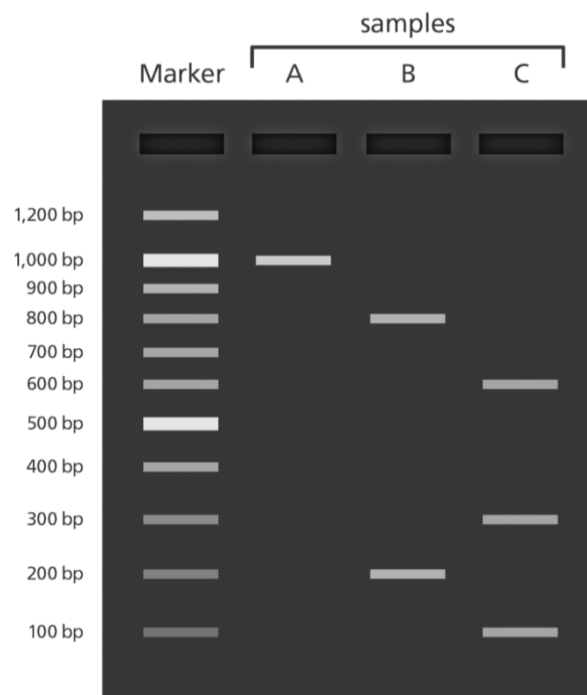
Etidium mengikat dengan cara menyisip di antara ikatan basa pada untai ganda DNA. Struktur cincin etidium bromida adalah hidrofobik dan mirip dengan struktur cincin pada DNA. Etidium dapat membentuk ikatan

van der waals tertutup dengan pasangan basa sehingga etidium mengikat pada lokasi hidrofobik molekul DNA. Molekul yang mengikat pada lokasi tersebut dikenal dengan *interchelate agent* karena mengikat pada susunan DNA yang kokoh. Etidium bromida merusak pilin ganda (*double helix*) dan menghambat replikasi dan transkripsi DNA. Oleh karena itu Etidium Bromida berpotensi sebagai mutagen (Gambar 19).



Gambar 19. Etidium Bromida sebagai *Interchelate Agent*. Terjadinya gangguan pada struktur rangka gula fosfat DNA ketika *Interchelate Agent* mengikat DNA, (What When How, 2017).

Setelah proses elektroforesis selesai, gel disinari sinar UV agar pita yang terbentuk dapat terlihat. Etidium bromida berpendar pada sinar UV menghasilkan pendaran berwarna orange pada panjang gelombang 600 nm. *Marker* atau penanda berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi. Hasil amplifikasi atau ampikon memiliki satuan pb atau panjang basa (bp, *base pairs*). Ukuran ampikon sampel dapat diketahui dengan cara mensejajarkan ukuran *marker* dengan ukuran ampikon sampel. Contoh hasil elektroforegram ditunjukkan pada Gambar 20.



Gambar 20. Elektroforegram hasil visualisasi gel agarosa. Lajur pertama merupakan *Marker DNA* sedangkan lajur A, B, dan C merupakan sampel DNA (Genome Research, 2016)

E. Gen *pef S.typhimurium* dan gen *fim-C E. coli*

Gen adalah bagian dari DNA kromosom yang mengkode satu buah molekul RNA spesifik, yang selanjutnya mengkode polipeptida tertentu. Gen tersusun dari DNA (*Deoxyribo Nucleid Acid*). DNA bersama-sama dengan protein histon dan non histon membentuk benang-benang kromatin yang selanjutnya menyusun kromosom.

Gen *pef* (*plasmid encoded fimbriae*) merupakan gen *fimbriae* yang berada pada plasmid. Gen *pef* berfungsi mengkode protein *fimbriae* pada pembentukan struktur permukaan filamen yang berperan dalam proses patogenesis (Rotger and Casadesus, 1999). Informasi umum mengenai gen *pef S. typhimurium* disajikan pada Tabel 1.

Gen *pef Salmonella typhimurium* berukuran 213 pb (pasang basa) berada pada urutan 4947 – 5159 dari *whole sequence* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* plasmid pSLT-BT. Urutan nukleotida dari gen *pef Salmonella typhimurium* berdasarkan dari database laman NCBI (Gene ID 8541913) ditunjukkan oleh Gambar 21.

ORIGIN	
1	atgagtgaat ccattgttac aaaaattatt tccatogtcc aggaacgtca gaacatggat
61	gacggcgcgc cagttaaac ccgcgatatt gccgatgctg cggactcag tatctaccag
121	gtccgcttgt atcttgagca actccacgat gtcgggggtgc ttgagaaagt gaatgccgga
181	aagggagttc ccggattatg gcgtctgctc tga

Gambar 21. Urutan nukleotida gen *pef Salmonella typhimurium*. Gen *pef Salmonella typhimurium* berukuran 213 bp berada pada urutan 4947 – 5159 dari *complete genome* (NCBI, 2016).

Tabel 1. Informasi umum gen *pef* bakteri *Salmonella typhimurium* (NCBI, 2015)

<i>Gene symbol</i>	<i>pefl</i>
<i>Gene description</i>	<i>Plasmid encoded fimbriae</i>
<i>Locus tag</i>	<i>pSLTBT_p006</i>
<i>Gene type</i>	<i>Protein coding</i>
<i>Organism</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i>

Gen *fim-C (fimbrial-C)* merupakan salah satu faktor penempelan dan kolonisasi (*adherence and colonization*) pada bakteri *Salmonella typhi*. Penempelan dan kolonisasi (*Adherence and colonization*) merupakan faktor pertahanan pertama sel inang terhadap bakteri patogen. Faktor pertahanan tersebut pada umumnya adalah lapisan permukaan mukosa, seperti saluran pernafasan. Walaupun sel epitel pada permukaan

tersebut berfungsi melindungi sel inang, namun bakteri memiliki kemampuan untuk menempel dan memperbanyak diri secara cepat. Kemampuan menempel tersebut didukung oleh dimilikinya berbagai komponen pendukung seperti flagella dan filli/fimbriae yang berfungsi menembus barrier sel epitel dan menyerang sel inang. Penempelan bakteri pada sel inang dijumpai oleh adanya reseptor yang dimiliki oleh sel inang pada permukaan sel, dan kemampuan adhesi dari bakteri. Gen *fim-C E.coli* berfungsi mengkode protein *fimbriae* yang berperan dalam pembentukan serat fibrial (Inoue *et al.*, 2007). Informasi umum mengenai gen *fim-C E. coli* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Informasi umum gen HSP 70 (NCBI, 2015)

<i>Gene symbol</i>	<i>fimC</i>
<i>Gene description</i>	<i>Periplasmic chaperone</i>
<i>Locus tag</i>	<i>b4316</i>
<i>Gene type</i>	<i>Protein coding</i>
<i>Organism</i>	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655</i>

Gen *fim-C Escherichia coli* berukuran 726 bp berada pada urutan 4544304 – 4545029 dari *whole sequence Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 complete genome*. Urutan nukleotida dari gen *fim-C Escherichia coli* berdasarkan dari database laman NCBI (Gene ID 948843) ditunjukkan oleh Gambar 22.

```

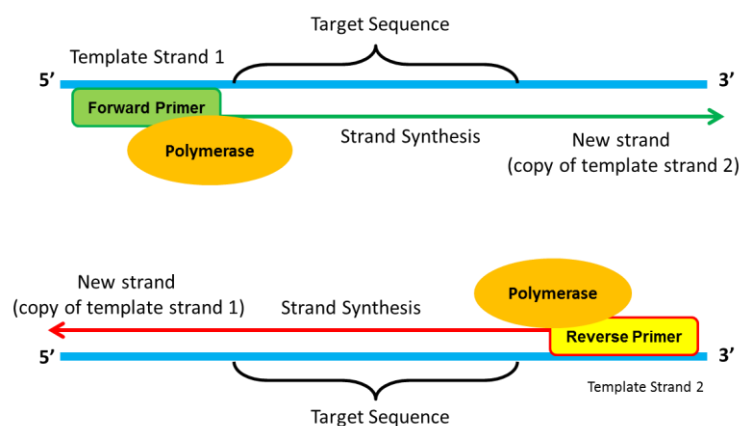
ORIGIN
  1  gtgagtaata aaaacgtcaa tgtaaggaaa tgcgaggaaa taacattctg cttgctggca
 61  ggtatcctga tgttcatggc aatgatgggt gccggacgcg ctgaagcggg agtggcctta
121  ggtgcgactc gcgtaattta tccggcaggg caaaaacaag agcaacttgc cgtgacaaat
181  aatgatgaaa atagtaccta ttttaattcaa tcatgggttg aaaatgccga tgggtgtaaag
241  gatggtcggt ttatcgtgac gcctcctctg tttgcatga agggaaaaaa agagaatacc
301  ttacgtattc ttgatgcaac aaataaccaa ttgccacagg accgggaaaag tttattctgg
361  atgaacgtta aagcgattcc gtcaatggat aaatcaaaat tgactgagaa tacgctacag
421  ctogcaatta tcagccgcat taaactgtac tatcgcccgg ctaaattagc gttgccaccc
481  gatcaggccg cagaaaaatt aagatttctg cgtagcgcga attctctgac gctgattaac
541  ccgacaccct attacctgac ggtaacagag ttgaatgccg gaaccgggtt tcttgaaaaat
601  gcattgggtg ctccaatggg cgaaagcacg gttaaattgc cttctgatgc aggaagcaat
661  attacttacc gaacaataaa tgattatggc gcacttacc ccaaaatgac gggcgtaatg
721  gaataa

```

Gambar 22. Urutan nukleotida gen *fim-C Escherichia coli*. Gen *fim-C Escherichia coli* berukuran 726 bp berada pada urutan 4544304 – 4545029 dari *complete genome* (NCBI, 2016).

F. Rancangan Primer

Primer yaitu urutan oligonukleotida dengan panjang tertentu yang berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Primer terdiri dari dua jenis yaitu primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* bergerak dari arah 5' ke arah 3' untai DNA *template*, sedangkan primer *reverse* bergerak dari arah 3' ke 5'. Arah pergerakan primer ditunjukkan oleh Gambar 23 (Konietzny and Greiner, 2003).



Gambar 23. Arah pergerakan primer *forward* dan primer *reverse*. *Forward* primer bergerak dari arah 5' ke 3' sedangkan *reverse* primer bergerak dari arah 3' ke 5' (Konietzny and Greiner, 2003).

DNA target dan primer sangat menentukan keakuratan dari metode deteksi *Salmonella* pada sampel makanan (Malorny, 2013). Bila primer yang dirancang tidak sesuai dengan sekuens DNA yang diinginkan, maka produk PCR yang dihasilkan akan keliru. Hal – hal yang harus diperhatikan dalam merancang primer adalah sebagai berikut (Konietzny, and Grenier 2003):

1. Tm Criteria

Temperature Melting (Tm) merupakan temperatur yang diperlukan oleh separuh primer yang mengalami disosiasi/lepas ikatan. Primer Tm sebaiknya berkisar antara 58°C - 60°C.

2. Ta criteria

Temperature Annealing (Ta) merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan *template* (cetakan) DNA dengan stabil. Jika suhu *annealing* tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer dengan *template* DNA sehingga akan menghasilkan produk PCR yang rendah. Sedangkan jika Ta terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada *template* DNA yang tidak spesifik. Suhu Ta biasanya adalah suhu Tm - 5°C.

3. Length criteria

Panjang optimal primer yaitu berkisar antara 18 – 30 nukleotida.

4. GC content

Komposisi %G+C yang ideal adalah yaitu antara 40-60%.
Komposisi %G+C yang rendah memungkinkan primer tidak dapat

menempel pada urutan DNA sehingga dapat menurunkan efisiensi proses PCR.

5. GC clamp

Jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir pada ujung 3' disebut dengan GC clamp. GC clamp yang baik tersusun atas 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C. Keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan *template* DNA yang diperlukan untuk tahap inisiasi DNA pada proses PCR.

6. Primer *Secondary Structure*, meliputi:

- a. *Hairpins* : terbentuknya struktur *loop/hairpin* (jepit rambut) pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur *hairpin*. *Hairpin* pada ujung 3' dibatasi dengan nilai $\Delta G = -2$ kcal/mol (energi yang diperlukan untuk memecah struktur *hairpin*) dan *hairpin* internal dibatasi dengan nilai $\Delta G = -3$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.
- b. *Self dimer*: primer dapat berikatan dengan primer lainnya yang sejenis dan disebut dengan *self dimer*.
- c. *Cross dimer*: primer dapat berikatan dengan primer pasangannya (*forward primer dan reverse primer*) dan disebut *cross dimer*.

7. *Repeats*

Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa

dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat ditoleransi, misalnya ATATATAT.

8. *Runs*

Primer sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang diulang terus-menerus. Pengulangan basa berurutan sampai 4 kali masih dapat ditoleransi, misalnya AGCGGGGGATGGGG memiliki urutan basa G yang diulang sebanyak 5 kali berturut –turut.

9. *Avoidance cross homology*

Analisis homologi primer dengan DNA genom melalui BLAST NCBI dilakukan untuk menghindari *cross homology*.

10. *Ampicon length*

Panjang ampikon yang ideal berkisar antara 50–150 pb.

11. *Genomic DNA avoidance*

Hasil *false-positive* memungkinkan terjadi karena amplifikasi yang terkontaminasi genom DNA sehingga diperlukan rancangan primer *spaning exon – exon junctions*.

Rancangan primer menggunakan real-time *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) diperlukan probe untuk memaksimalkan kinerja dari primer. Probe adalah oligonukleotida yang terdiri dari *reporter dye* yang menempel pada ujung 5' dan *quencher dye* yang menempel pada ujung 3' (Premier Biosoft, 2016).

Terdapat beberapa macam jenis probe untuk format deteksi Realtime PCR, diantaranya yaitu:

1. SYBR Green I

Ketika SYBR Green berikatan dengan primer dsDNA, akan terjadi peningkatan fluoresensi. Selama tahapan PCR yang berbeda, intensitas dari sinyal fluoresensi akan berbeda, tergantung dari jumlah dsDNA yang ada.

2. Hybridization Probe (*HybProbe*)

Hybridization probe merubah fluoresensi pada saat hibridisasi dengan "*Fluorescence Resonance Energy Transfer*" (FRET). Dua probe oligonukleotida sekuen spesifik dilabel dengan pewarna yang berbeda (donor dan aseptor) dan ditambahkan ke dalam "master mix". Adanya produk amplifikasi spesifik dalam analisa *hybprobe* dapat dibaca secara kuantitatif berdasarkan peningkatan fluoresensi. Produk amplifikasi bersifat spesifik karena dua probe dihibridisasi dan primer-dimer tidak terdeteksi karena probe sekuen spesifik tidak mengenalinya. Jenis probe ini dapat digunakan untuk aplikasi deteksi mutasi, analisis SNP, genotyping SNP, qPCR dan multiplex tes.

3. Taqman Probe

Taqman probe atau hydrolysis probe menggunakan aktivitas exonuclease 5' dari DNA Polymerase. Sebuah probe terdiri dari 2 label yaitu *fluorescence reporter* dan *fluorescence quencher* yang sangat dekat satu sama lain. Ketika probe masih utuh, *quencher* menahan sinyal fluoresensi reporter. Aktivitas exonuclease 5' dari

DNA Polymerase pada proses PCR yaitu dengan memotong hidrolisis probe dan memisahkan reporter dan quencher. Sinyal fluoresensi reporter tidak lagi tertahan dan dapat memancarkan sinyal fluoresensi. Peningkatan sinyal fluoresensi dari reporter berbanding langsung dengan akumulasi produk PCR.

4. Simple Probe

Simple probe adalah bentuk sederhana dari hybridization probe dan hanya menggunakan 1 probe saja. Ketika terjadi hibridisasi akan memancarkan sinyal fluoresensi yang lebih besar. Perubahan sinyal fluoresensi tergantung dari status hibridisasi dari probe, semakin stabil hibridisasinya maka semakin tinggi temperatur *melting*. Kelebihan simple probe dibanding Taqman Probe pada *end point genotyping* yaitu dapat mendeteksi varian SNP.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

Secara spesifik penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan:

1. Isolat DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*.
2. Informasi tentang cara merancang primer.
3. Molekul primer *S. typhimurium* dan *E. coli*.
4. Amplikon fragmen gen *pef* *S. typhimurium* dan fragmen gen *fim-C* *E. coli*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, dan Laboratorium DNA, Pusat Laboratorium Forensik, Badan Reserse Kriminal, Kepolisian Republik Indonesia. Waktu penelitian berlangsung dari bulan Januari – Desember 2016.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan meliputi:

1. Pemiakan bakteri
2. Isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* dari biakan murni
3. Perancangan primer
4. Amplifikasi DNA oleh pasangan primer hasil rancangan
5. Uji konfirmasi hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (All American), DNA *quantification* (Mastro Gen), tabung mikrosentrifuge 1,5 mL (Extragene), mikrosentrifuge (Denver Instrument), *Digital Balance* (Metler Tolledo), pipet mikro 0,2-20 μ L, 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, dan 100-1000 μ L (Labnet) dengan tip steril, Shaking Water bath (Stuart SDS40), GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem; Perkin Elmer), inkubator (Mettmert), *Water Bath* (Mettmert), *Laminar Airflow* (Esco), tabung Eppendorf, *Vortex Mixer* (Maxi Mix II), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys), Lemari pendingin (Polytron), freezer (Sharp), *Hotplate* (Stuart), satu set alat elektroforesis (BioRad), kertas parafilm, UV transluminator (Biostep), jarum ose steril, pemanas bunsen, alat-alat kaca (Pyrex Iwaki), dan alat dokumentasi (Samsung).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri-bakteri dalam medium padat miring yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UI yaitu bakteri *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli*. Selanjutnya bakteri-bakteri tersebut dibiakkan dan diremajakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNJ sebagai bakteri uji, media cair *Luria Broth* (mengandung *yeast extract* dan *sodium chloride*, pH 7.0) (Deben Diagnostics Ltd), media padat *Salmonella Shigela Agar*

(mengandung *beef extract*, *peptic digest of animal tissue*, *lactose*, *bile salt mixture*, *sodium citrate*, *sodium thiosulphate*, *ferric citrate*, *brilliant green*, *neutral red*, dan agar, pH 7.2) (Deben Diagnostics Ltd), media padat Endo Agar (mengandung *peptic digest of animal tissue*, *lactose*, *dipotassium biphosphate*, *sodium sulphite*, dan agar, pH 7.5) (Deben Diagnostics Ltd) kit isolasi DNA *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* Cat No. #K0721 (mengandung *Digestion Solution*, *Lysis Solution*, *RNase A Solution*, *Proteinase K Solution*, *Wash Buffer*, dan *Elution Buffer*) (ThermoScientific), etanol 50%, primer *S.typhimurium*, primer *E.coli* (Macrogen Inc), PCR *Master Mix* Cat No. #K0171 (mengandung 0.05 U/ μ L *Taq DNA Polimerase*, *reaction buffer*, 4 mM $MgCl_2$, dan 0.4 mM tiap dNTP) (ThermoScientific), *Nuclease Free Water* (ThermoScientific), Agarosa (Promega), *Loading Dye* 6x (Promega), *buffer* TAE 1x (mengandung 40 mM Tris pH 7.6, 20 mM asam asetat, dan 1 mM EDTA) (Promega), etidium bromida 0,1% (Promega), DNA ladder 1 kb (Promega; Biorad), DNA ladder 100 bp (ThermoScientific).

E. Prosedur Kerja

1. Pemiakan Bakteri

Bakteri biakan dalam medium padat miring diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi UI yaitu bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*. Selanjutnya bakteri-bakteri tersebut dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNJ sebagai bakteri uji. Semua proses pembiakan dilakukan dalam *laminar airflow* untuk mencegah kontaminasi mikroorganismenya lain.

1.1 Pembiakkan Bakteri pada Media LB Broth

Biakan bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* dalam gliserol stock diambil dengan jarum ose steril, lalu dicelupkan kedalam 5 mL medium *LB Broth* steril. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam (*overnight culture*). Hasil biakan bakteri diperiksa setelah masa inkubasi tersebut. Timbulnya kekeruhan pada media menunjukkan bahwa bakteri tumbuh dengan baik.

1.2 Pembiakan Bakteri *Salmonella typhimurium* pada Media Selektif *Salmonella-Shigella Agar (SSA)*

Medium selektif yang digunakan adalah medium SSA. Pertama-tama biakan bakteri *S. typhimurium* dari media cair LB diinokulasi dengan jarum ose steril, lalu digoreskan secara zig-zag (*streak plate method*) pada medium agar dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam (*overnight culture*). Hasil biakan bakteri diperiksa setelah waktu inkubasi tersebut. Munculnya koloni berwarna hitam merupakan indikator bahwa bakteri yang tumbuh adalah benar-benar bakteri *S. typhimurium*.

1.3 Pembiakkan Bakteri *E. coli* pada Media *ENDO Agar*

Medium selektif yang digunakan adalah medium *ENDO Agar*. Pertama-tama biakan bakteri *E.coli* dari media cair LB diinokulasi dengan jarum ose steril, lalu digoreskan secara zig-zag (*streak plate method*) pada medium agar dalam cawan petri yang telah disterilisasi.

Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam (*overnight culture*). Hasil biakan bakteri diperiksa setelah waktu inkubasi tersebut. Munculnya koloni berwarna hijau keperakan merupakan indikator bahwa bakteri yang tumbuh adalah benar-benar bakteri *E.coli*.

1.4 Pembuatan *Glycerol Stock* bakteri.

Hal pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan *overnight culture* bakteri-bakteri yang telah dibiakkan dalam medium *LB Broth*. Kemudian, 200 μ L *filter-sterilized glycerol* (50%) yang berfungsi sebagai media tumbuh dimasukkan kedalam tabung eppendorf. Selanjutnya ditambahkan 800 μ L *overnight culture* bakteri kedalam tabung tersebut. Campuran dalam tabung eppendorf dimasukan kedalam wadah berisi *dry ice* dan etanol 70% untuk membuat suhu -120°C. Kemudian gliserol stock disimpan pada suhu -20°C di dalam freezer.

2. Isolasi DNA Bakteri dari Biakan Murni dan Karakterisasinya

Tahapan yang dilakukan untuk proses isolasi genom bakteri dengan menggunakan kit isolasi DNA *GeneJet Genomic DNA Purification Kit* mengacu pada protocol standar adalah sebagai berikut: sebanyak 1 mL biakan bakteri yang telah ditumbuhkan 16-18 jam (*overnight culture*) dimasukkan dalam tabung *microcentrifuge* eppendorf 1,5 mL lalu disentrifugasi pada 5000 x g selama 10 menit sampai dihasilkan residu

(pelet sel). Supernatan dikeluarkan dengan cara menuangkan sisa media kedalam *beaker glass* sebagai penampung yang sudah diberi desinfektan.

Selanjutnya residu yang diperoleh ditambahkan 180 μL *digestion solution* untuk melisiskan dinding nukleus. Residu diresuspensi dengan cara pipetkan naik turun dari campuran tersebut sampai homogen. Selanjutnya ditambahkan 20 μL *Proteinase K solution* ditambahkan pada cairan lisat bakteri untuk mengendapkan kandungan protein yang ada pada DNA. Inkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit untuk melisiskan sel bakteri dan memaksimalkan pembersihan kandungan protein, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 20 μL *RNase solution* pada cairan lisat bakteri untuk mengurai molekul RNA, kemudian divortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 200 μL *lysis solution*, divortex selama 15 detik untuk menghomogenkan campuran. Selanjutnya ditambahkan 400 μL etanol 50% untuk melarutkan senyawa-senyawa selain DNA, kemudian divortex. Hasil lisat sel dipindahkan ke dalam *purification column*, kemudian disentrifus selama 1 menit pada 7000 x g. Kemudian pelet yang didapat dilarutkan dalam 500 μL *wash buffer I* dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 8000 x g. Kemudian pelet yang didapat, ditambahkan dalam 500 μL *wash buffer II* untuk mencuci DNA dari pengotor dan disentrifus selama 3 menit pada kecepatan 12.000 x g. Mengganti *purification column* dan menambahkan 200 μL *elution buffer* untuk mengikat pengotor selain DNA sehingga DNA terpisah secara

sempurna dan disentrifus pada kecepatan 8000 x g selama 1 menit. Isolat DNA bakteri yang didapat kemudian dipindahkan kedalam tabung eppendorf 1,5 mL. Hasil isolasi DNA disimpan pada suhu -20°C (ThermoScientific, 2014).

Hasil isolasi DNA lalu dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa 1.5 % menggunakan pewarna etidium bromida. Sebanyak 8 μL sampel DNA hasil isolasi dicampur dengan 2 μL *loading dye* 6x yang berfungsi sebagai pemberat agar sampel tidak keluar dari *well*, selanjutnya dimasukkan dalam *well* gel agarosa yang telah disiapkan dalam *chamber* alat *mini-sub DNA Electrophoresis Cell* yang telah diisi dengan buffer TAE 1X yang berfungsi untuk mempertahankan pH selama elektroforesis berlangsung. Elektroforesis dilakukan pada arus 70 volt selama 60 menit. Pemeriksaan hasil dilakukan dengan bantuan sinar UV pada panjang gelombang 260 nm. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan pemotretan diatas lampu UV menggunakan alat dokumentasi.

3. Perancangan Primer

Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer-BLAST pada laman NCBI melalui portal <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Primer-BLAST merupakan program yang digunakan untuk merancang primer spesifik yang berguna sebagai *template* PCR. Program ini akan memberi pilihan beberapa kandidat primer yang dapat digunakan.

Pasangan primer yang dipilih harus memiliki panjang primer yang berkisar antara 18-30 nukleotida, memiliki komposisi % G+C antara 50 - 60 %, memiliki basa G atau C pada ujung 3' primer, memiliki panjang amplicon antara 50 - 150 bp dan memiliki T_m antara 59 - 60⁰C (Konietzny and Grenier, 2003).

Kandidat pasangan primer pilihan selanjutnya dilakukan analisis primer menggunakan program NetPrimer (Premier BioSoft) dan dilakukan uji *cross* reaksi secara *in silico* menggunakan program BLAST (NCBI). Primer hasil rancangan selanjutnya disintesis oleh MacroGen Inc. Korea (BioSM Indonesia).

4. Amplifikasi DNA Bakteri Hasil Isolasi

Amplifikasi DNA menggunakan pasangan primer hasil rancangan dilakukan dalam total volume 25 μ L. Komponen reaksi PCR terdiri dari 12.5 μ L PCR *Master Mix* Cat No. #K0171 (mengandung 0.05 U/ μ L *Taq DNA Polimerase*, *reaction buffer*, 4 mM $MgCl_2$, dan 0.4 mM tiap dNTP), 8.5 μ L *Nuclease Free Water*, 1.0 μ L *reverse primer* (12.5 μ M), 1.0 μ L *forward primer* (12.5 μ M) dan 2.0 μ L isolat DNA. Tahap denaturasi awal dilakukan pada suhu 95⁰C selama 3 menit, tahap denaturasi pada suhu 95⁰C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 56⁰C selama 30 detik, tahap ekstensi pada suhu 72⁰C selama 1 menit dan tahap ekstensi akhir pada suhu 72⁰C selama 10 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus.

5. Uji Konfirmasi Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Uji konfirmasi dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% menggunakan pewarna etidium bromida. Sebanyak 8 μ L sampel hasil amplifikasi PCR dicampur dengan 2 μ L *loading dye* 6x yang berfungsi sebagai pemberat agar sampel tidak keluar dari *well*, selanjutnya dimasukkan dalam *well* gel agarosa yang telah disiapkan dalam *chamber* alat *mini-sub DNA Electrophoresis Cell* yang telah diisi dengan buffer TAE 1X yang berfungsi untuk mempertahankan pH selama elektroforesis berlangsung. Elektroforesis dilakukan pada arus 70 volt selama 60 menit. Pemeriksaan hasil dilakukan dengan bantuan sinar UV pada panjang gelombang 260 nm. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan pemotretan di atas lampu UV menggunakan alat dokumentasi.

F. Teknik Pengumpulan Data

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data deskriptif dengan cara membandingkan hasil elektroforesis pada setiap perlakuan:

1. Kadar DNA (ng/ μ L) dan kemurnian DNA (A_{260/280}) hasil isolasi yang didapat dari pengukuran dengan spektrofotometer pada rasio absorbansi 260 nm dan 280 nm.
2. Pita DNA (pb) hasil isolasi DNA yang didapat dari elektroforesis gel agarosa 1,5% dan divisualisasi dengan UV transluminator.
3. Pita DNA (pb) hasil amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR yang didapat dari elektroforesis gel agarosa 2% dan divisualisasi dengan UV-transluminator.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan isolat DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*, menghasilkan informasi cara merancang primer, memperoleh molekul primer serta memperoleh fragmen gen *pef* *S. typhimurium* dan fragmen gen *fim-C* *E. coli*. Hasil penelitian ini diuraikan menjadi beberapa bagian sebagai berikut: (A) Pemiakan bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*, (B) Isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* dari biakan murni, (C) Perancangan primer, (D) Amplifikasi DNA oleh primer dan karakterisasinya.

A. Pemiakan Bakteri *S. typhimurium* dan *E.coli*

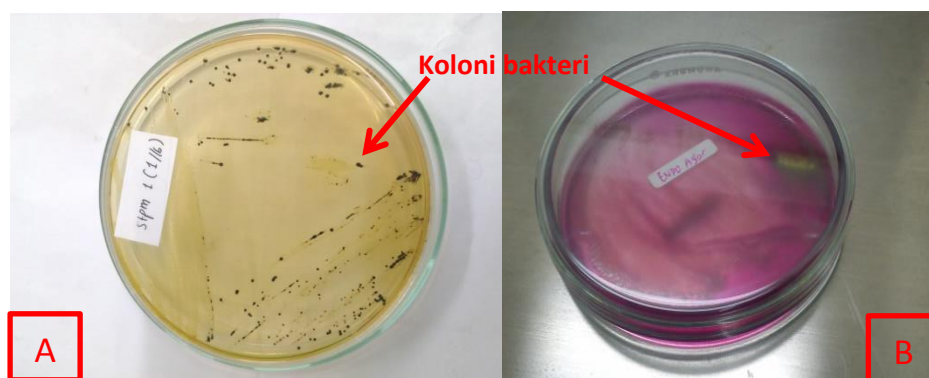
Pemiakan bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* bertujuan untuk memperoleh kultur bakteri. Pemiakan bakteri dilakukan pada medium Luria Bertani (LB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Kultur bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* ditunjukkan pada Gambar 24.



Gambar 24. Kultur Bakteri pada Medium LB. (A) Kultur bakteri *S. typhimurium* (B) Kultur bakteri *E.coli*.

Media Luria Bertani (LB) merupakan media yang baik untuk memicu pertumbuhan bakteri. Media LB mengandung tripton, NaCl dan ekstrak ragi. Tripton dan ekstrak ragi menyediakan kebutuhan nitrogen, nutrient organik dan anorganik yang diperlukan bakteri untuk berkembang biak. Hasil kultur bakteri pada Gambar 24 menunjukkan kekeruhan pada media LB yang menandakan bahwa bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* telah tumbuh.

Identifikasi bakteri diperlukan untuk mengkonfirmasi keberadaan bakteri uji pada media LB. Identifikasi bakteri *S. typhimurium* menggunakan media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) sedangkan identifikasi bakteri *E. coli* menggunakan media selektif Endo Agar. Hasil identifikasi bakteri pada media selektif ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. Kultur Bakteri dalam Medium SSA dan Endo Agar. (A) Kultur bakteri *S. typhimurium* ditandai dengan munculnya koloni hitam (B) Kultur bakteri *E. coli* ditandai dengan munculnya koloni hijau metalik.

Media SSA merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* dan *Shigella sp.* Media SSA mengandung *beef extract*, *peptone*, *lactose*, *bile salt mixture*, *sodium citrate*, *sodium thiosulphate*,

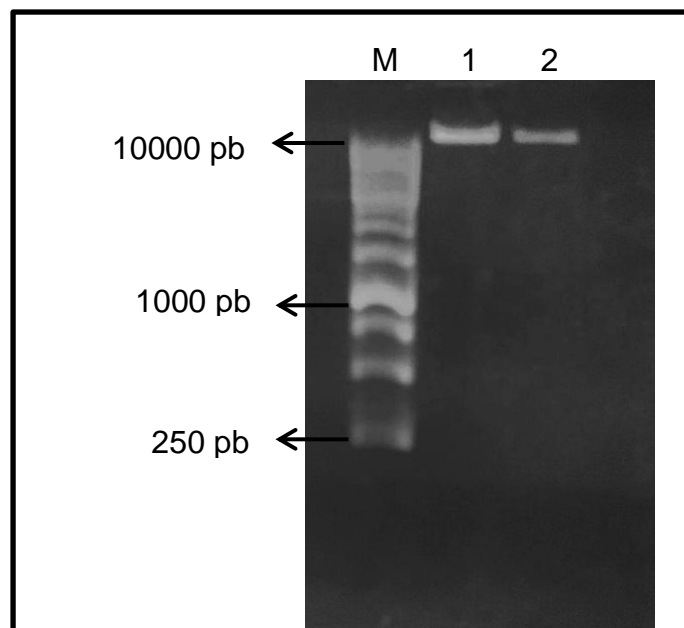
ferric citrate, *brilliant green*, *neutral red*, dan agar yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain sehingga hanya *Salmonella sp.* dan *Shigella sp.* yang akan tumbuh dan berkembang (Afifah, 2013). Koloni bakteri *Salmonella sp.* pada media SSA berwarna hitam. Warna hitam yang terbentuk menunjukkan adanya pemanfaatan sodium tiosulfat oleh bakteri *Salmonella sp.* sebagai sumber sulfur untuk memproduksi gas H₂S dan memecah asam amino yang mengandung sulfur sehingga terbentuklah endapan garam FeS yang menyebabkan adanya warna hitam pada bagian tengah koloni (Lubis, 2015; Budiarmo dan Belo, 2009).

Media Endo Agar merupakan media selektif dan media diferensial yang digunakan untuk mengisolasi bakteri gram negatif berdasarkan kemampuan bakteri memfermentasi laktosa atau tidak. Media Endo Agar mengandung natrium sulfat dan fuchsin yang berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Warna koloni merah disebabkan bakteri *E. coli* memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Koloni hijau metalik disebabkan bakteri *E. coli* bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin tersebut diserap (Hazar *et al.*, 2011).

B. Isolasi DNA Bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli*

Isolasi DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* dari biakan murni bertujuan untuk mendapatkan isolat DNA bakteri. Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA *GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermoscientific)*. Prinsip dari kit isolasi ini ialah pemurnian DNA/asam

nukleat berdasarkan spin kolom. Pemurnian asam nukleat berbasis spin kolom merupakan metode ekstraksi fasa padat untuk memurnikan asam nukleat. Asam nukleat akan mengikat fasa padat silika pada kondisi tertentu (Tolosa *et al.*, 2007). Metode pemurnian asam nukleat ini terdiri dari empat tahap yaitu *lysis*, *bind*, *wash*, dan *elution*. Sel sampel akan pecah dengan prosedur lisis kemudian *buffer solution* ditambahkan ke dalam sampel sehingga akan membentuk *binding solution* dengan DNA akibat proses presipitasi etanol. Presipitat yang dihasilkan kemudian dilakukan proses pencucian yang bertujuan untuk menghilangkan kontaminan berupa protein dan debris sel sehingga hanya asam nukleat yang akan terikat pada membran. Penambahan *elution buffer* pada tahap terakhir akan melulusi asam nukleat dari membran sehingga asam nukleat terkumpul pada dasar kolom. Elektroforegram isolat DNA yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 26.



Gambar 26. Elektroforegram DNA Bakteri. Keterangan (M) Marker DNA 1 Kb (1) DNA *S. typhimurium* (2) DNA *E. coli*

Berdasarkan data hasil elektroforesis pada Gambar 26 menunjukkan bahwa terdapat pita DNA pada lajur 1 dan 2. Panjang DNA yang berhasil diisolasi memiliki ukuran lebih dari 10000 pb baik pada sampel bakteri *S. typhimurium* maupun bakteri *E. coli*. Hasil tersebut ditunjukkan oleh pendaran pita DNA pada gel agarosa yang berada di atas *marker* DNA. Hal ini disebabkan pewarnaan gel oleh senyawa etidium bromida. Etidium bromida merupakan zat warna berfluoresensi yang dapat terikat diantara pasangan basa dan membuat molekul DNA lebih kaku. Ikatan yang terbentuk akan meningkatkan intensitas fluoresensi dari zat warna bebasnya (Kusuma, 2010). Pita-pita yang terbentuk pada setiap gel agarosa disebabkan adanya proses pemisahan DNA berdasarkan berat molekulnya. Gel agarosa akan membentuk kerangka pori-pori yang kompleks untuk dilewati molekul DNA. Molekul DNA yang bermuatan negatif akan bermigrasi menuju kutub positif ketika dialiri arus listrik melalui pori-pori agarosa. Semakin kecil ukuran molekul DNA maka semakin cepat migrasinya melewati gel sehingga molekul DNA akan terpisah berdasarkan ukurannya. Perbedaan kecepatan pergerakan ini akan terlihat pada pita-pita yang tergambar pada tiap lajur.

Munculnya pita DNA pada ukuran lebih dari 10000 pb (10^4 pb) menunjukkan bahwa hasil ini sesuai dengan informasi *database* tentang ukuran DNA genom bakteri. Hasil penelusuran dari beberapa literatur menunjukkan bahwa ukuran DNA genom bakteri *S. typhimurium* sebesar $4,86 \times 10^6$ pb dan ukuran DNA genom bakteri *E.coli* sebesar $4,8 \times 10^6$ pb

(Sanger Institute, 2016; Perna *et al.*, 2001). Hasil elektroforegram pada Gambar 26 juga memperlihatkan pita tunggal DNA pada masing-masing isolat DNA bakteri. Pita tunggal DNA mengindikasikan bahwa DNA genom bakteri tidak terdegradasi (Pambudiono *et al.*, 2016). Pendaran pita yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) pada isolat DNA *S. typhimurium* menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh (Ludyasari, 2013). DNA total bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* yang berukuran $4,86 \times 10^6$ pb dan $4,8 \times 10^6$ pb menunjukkan materi genetik dari DNA kromosom dan DNA plasmid. DNA kromosom berperan dalam penentuan proses metabolisme bakteri sedangkan DNA plasmid berperan dalam penentuan sifat patogen, sifat fertilitas dan sifat resistensi terhadap antibiotik tertentu. DNA kromosom pada bakteri berupa rantai ganda melingkar yang terkumpul dalam suatu serat kusut (*region nucleoid*) sedangkan DNA plasmid memiliki bentuk melingkar (sirkuler) dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan DNA kromosom (Astuti, 2016).

Analisis kuantitatif DNA dilakukan dengan cara pengukuran konsentrasi DNA menggunakan nanospektrofotometer (Lampiran 2). Konsentrasi dan kemurnian isolat DNA bakteri disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data analisis kuantitatif hasil isolasi DNA

Bakteri	A260/280	Konsentrasi (ng/ μ L)	Volume DNA (μ L)	Jumlah DNA (ng)	Rendemen (%)
<i>S. typhimurium</i>	2.009	29.08	200	5816	46.53
<i>Escherichia coli</i>	1.989	15.01	200	3002	24.02

Pita DNA menyerap spektrum sinar UV pada panjang gelombang 260 nm sedangkan kontaminan protein dan fenol menyerap spektrum sinar UV pada panjang gelombang 270 nm. Kemurnian sampel DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Hutchins and Kodolka, 2014). A260/280 merupakan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang digunakan untuk menentukan kemurnian DNA. Ludyasari (2013) mengatakan bahwa hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/280 antara 1,8 hingga 2,0. Jika nilai rasio A260/280 melebihi 2,0 maka isolat DNA masih mengandung kontaminan dari protein membran atau senyawa lain dan kadar DNA yang diperoleh belum murni, sedangkan jika nilai rasio A260/280 kurang dari 1,8 maka isolat DNA masih mengandung kontaminan fenol atau pelarut lain dan kadar DNA yang diperoleh terlalu sedikit. Rendemen dihitung berdasarkan protokol standar dari kit dengan ketentuan sejumlah 1×10^9 sel bakteri *E. coli* yang terekstraksi akan menghasilkan isolat DNA sebanyak 10-15 μg atau sekitar 10.000-15.000 ng (Thermoscientific, 2014).

Berdasarkan data yang terlihat pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa isolat DNA *S. typhimurium* dan isolat DNA *E. coli* memiliki kemurnian tinggi dan kadar DNA yang rendah. Rendemen DNA yang diperoleh kurang dari 50% mengindikasikan bahwa tahapan isolasi DNA yang dilakukan belum efektif. Konsentrasi DNA yang diperoleh rendah diduga disebabkan karena DNA yang terekstraksi dalam jumlah sedikit. Aspek

teknis dari setiap tahapan isolasi DNA harus benar-benar diperhatikan karena dapat mempengaruhi hasil isolasi. Sampel bakteri yang akan diisolasi harus berasal dari kultur bakteri baru karena sel-sel bakterinya sedang tumbuh optimal dan mengandung inti sel pada kondisi yang baik sehingga mengandung DNA yang cukup banyak untuk diekstrak. Proses sentrifugasi sebaiknya dilakukan menggunakan alat *ultra-microcentrifuge*. Hal ini bertujuan agar tahap sentrifugasi berjalan dengan kecepatan optimum. Bagian-bagian sel akan lisis pada kecepatan rotasi tertentu. Proses lisis sel bakteri yang belum sempurna dapat menyebabkan penghancuran inti sel dan asam nukleat yang belum optimal sehingga DNA yang terambil pun menjadi sedikit. Pengeringan alkohol yang kurang sempurna juga memungkinkan terjadinya kontaminasi yang dapat memberikan pengaruh pada perhitungan absorbansi dengan spektrofotometer (Ludyasari, 2013).

C. Perancangan Primer

Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer-BLAST pada laman NCBI. Primer-BLAST merupakan program yang digunakan untuk merancang primer spesifik yang berguna sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Program ini akan memberi pilihan beberapa kandidat primer. Urutan gen yang digunakan untuk dasar perancangan primer adalah gen *pef* dari sekuen genom *Salmonella typhimurium* LT2 dan gen *fimC* dari sekuen genom *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655.

Pemilihan kandidat primer telah memenuhi syarat-syarat kandidat primer berdasarkan ketentuan dari beberapa referensi yang digunakan pada tahap perancangan primer (Konietzny and Greiner, 2003; Kazuko, 2001; Genomic Lab, 2016; Premier Biosoft, 2013). *Pertama*, primer yang dipilih oleh peneliti memiliki panjang primer 20 pb pada urutan *forward primer* dan *reverse primer*. Menurut Kazuko Aoyagi (2001) primer yang digunakan dalam PCR sebaiknya memiliki urutan 18-28 pb. Semakin pendek ukuran primer akan menyebabkan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat lain yang tidak dikehendaki), sedangkan jika panjang primer lebih dari 30 pb tidak menyebabkan bertambahnya spesifisitas dan akan berpengaruh pada T_m primer. Selain merupakan rentang panjang primer ideal, pertimbangan *cost* atau biaya juga sangat diperhatikan dalam perancangan dan sintesis primer. Semakin panjang primer, biaya sintesis primer pun akan semakin mahal.

Kedua, suhu leleh (T_m) antara *forward* dan *reverse* memiliki perbedaan yang tidak terlalu jauh. Hasil rancangan primer kedua bakteri ini menghasilkan T_m yang berkisar antara $\sim 60^\circ\text{C}$. Hal ini dimaksudkan agar *running* PCR dapat dilakukan dalam satu waktu untuk dua primer sekaligus. Suhu ini digunakan sebagai acuan untuk optimasi T_a (suhu *annealing* penempelan primer pada cetakan DNA), yang merupakan tahapan penting dalam proses amplifikasi DNA.

Ketiga, persentase GC pada urutan primer memiliki komposisi yang ideal yaitu 50%-60% (Genomic Lab, 2016). Pada untai DNA pasangan

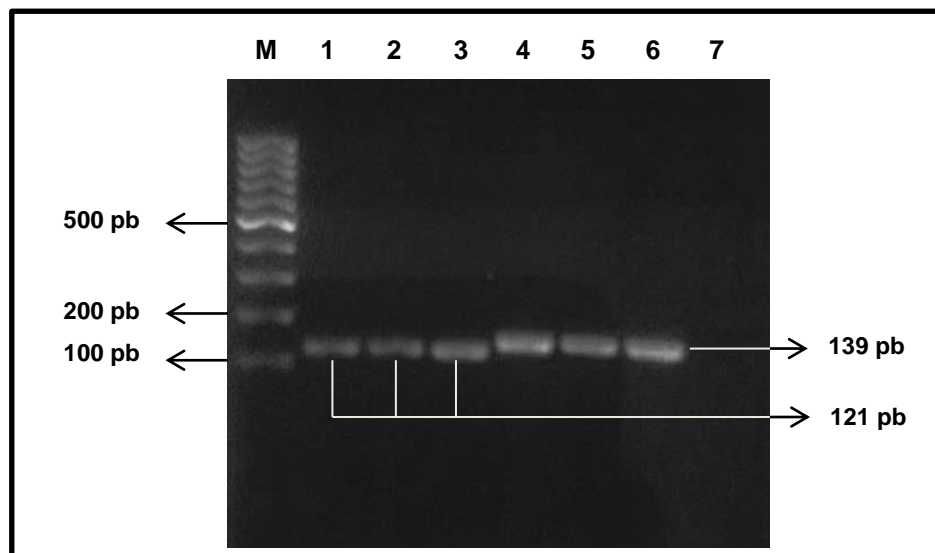
basa G dan C melibatkan tiga ikatan hidrogen sedangkan untuk pasangan A dan T hanya melibatkan dua ikatan hidrogen. Menurut Fessenden (1986) ikatan hidrogen seperti perekat antara molekul dan juga berfungsi sebagai perekat antara primer dengan template DNA yang diperlukan pada tahap inisiasi proses PCR.

Keempat, produk hasil amplifikasi (amplikon) menghasilkan panjang 139 pb dan 121 pb. Pemilihan panjang amplikon ini sesuai dengan rentang produk amplikon yang ideal untuk tahap PCR konvensional maupun realtime PCR yaitu 50-150 pb (Premier Biosoft, 2013). Selain itu pemilihan panjang amplikon ini disesuaikan dengan tujuan perancangan primer yaitu untuk dapat membedakan bakteri *S. typhimurium* dengan bakteri *E. coli*.

Kelima, pada perancangan primer harus diminimalisir terjadinya *primer secondary structure* yaitu kemungkinan-kemungkinan primer akan membentuk struktur baru berupa *hairpin*, *self dimer*, dan *cross dimer*. *Primer secondary structure* akan memicu terjadinya disosiasi atau pemutusan ikatan. Terputusnya ikatan hidrogen pada nukleotida primer akan mempengaruhi proses *annealing* primer pada *template* DNA sehingga proses *annealing* primer tidak akan optimal dan hal ini mengakibatkan proses amplifikasi untai DNA menjadi tidak maksimal. Terbentuknya *primer secondary structure* ini tidak dapat dihindari namun masih dapat diminimalisir dengan memilih kandidat pasangan primer yang memiliki nilai *primer secondary structure* yang kecil.

D. Amplifikasi DNA oleh Primer dan Karakterisasinya

Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* 56°C selama 30 detik dan tahap ekstensi 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi selanjutnya dikonfirmasi untuk memastikan keberhasilan amplifikasi dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 2%. Visualisasi dilakukan diatas cahaya UV menggunakan alat UV transluminator kemudian dilakukan dokumentasi oleh kamera. Elektroforegram hasil amplifikasi ditunjukkan oleh Gambar 27.



Gambar 27. Elektroforegram fragmen gen *fimC* *E.coli* dan gen *pef* *S.typhimurium* pada gel agarosa 2%. (M) DNA ladder 100 bp (1) fragmen gen *fimC* *E.coli* -a (2) fragmen gen *fimC* *E.coli* -b (3) fragmen gen *fimC* *E.coli* -c (4) fragmen gen *pef* *S.typhimurium* -a (5) fragmen gen *pef* *S.typhimurium* -b (6) fragmen gen *pef* *S.typhimurium* -c (7) kontrol negatif

Hasil analisis kualitatif pada Gambar 27 menunjukkan bahwa terdapat pita DNA pada lajur 1 sampai 6 untuk masing-masing *template* DNA dengan tiga kali pengulangan. Terbentuknya pita DNA menunjukkan bahwa suhu *annealing* sebesar 56°C yang digunakan sesuai untuk primer

yang dirancang. Suhu *annealing* ini menunjukkan bahwa proses penempelan primer pada *template* DNA target berjalan dengan baik. Menempelnya primer pada DNA target akan memicu enzim polimerase untuk mengkatalisis pemasangan basa nitrogen komplemen yang ada dalam reagen ke dalam DNA *template* sehingga akan terbentuk DNA baru.

Gambar 27 juga menunjukkan adanya satu fragmen DNA yang berhasil diamplifikasi oleh masing-masing primer *S. typhimurium* dan primer *E.coli*. Pita DNA yang terbentuk berada pada posisi 121 pb dan 139 pb. Hal ini menunjukkan bahwa pasangan primer *S. typhimurium* dapat mengamplifikasi DNA *S.typhimurium* dan membatasi fragmen DNA sehingga dapat menghasilkan ampikon sebanyak 139 pb. Hasil penelitian ini menunjukkan kesesuaian dengan rancangan primer sebelumnya. Primer *S. typhimurium* dirancang berdasarkan urutan gen *pef* yang berukuran 213 pb dan berada pada urutan nukleotida 4947 – 5159 dari urutan plasmid *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium*. Gen *pef* berfungsi mengkode protein *fimbriae* pada pembentukan struktur permukaan filamen yang berperan dalam proses patogenesis (Rotger and Casadesus, 1999).

Pita DNA yang terbentuk pada posisi 121 pb menunjukkan bahwa pasangan primer *E. coli* dapat mengamplifikasi DNA *E. coli* dan membatasi fragmen gen *fim-C*. Hasil ini juga sesuai dengan rancangan primer sebelumnya dimana primer *E. coli* dirancang berdasarkan urutan

gen *fim-C* yang berukuran 726 pb. Gen *fim-C E.coli* berada pada urutan nukleotida 4544304 – 4545029 dari urutan genom *Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655*. Gen *fim-C E. coli* merupakan gen yang mengkode protein *fimbriae* yang berperan sebagai faktor virulensi pada jenis strain *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC). Gen ini berperan penting pada proses pembentukan serat fibrial (Inoue *et al.*, 2007).

Keberhasilan amplifikasi DNA bergantung pada konsentrasi dan kemurnian sampel DNA, enzim taq polimerase, ukuran panjang primer komposisi primer dan tingkat homologi primer dengan DNA target sehingga faktor-faktor tersebut harus dikontrol secara hati-hati.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa DNA bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* berhasil diisolasi menghasilkan jumlah DNA total masing-masing sebesar 5816 ng dan 3002 ng dengan rendemen sebesar 46,53% dan 24,02%. Hasil rancangan primer diperoleh pasangan primer masing-masing berukuran 20 pb. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* 56°C selama 30 detik dan tahap ekstensi 72°C selama 1 menit. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa primer *S. typhimurium* dapat mengamplifikasi fragmen gen *pef* bakteri *S. typhimurium* menghasilkan panjang ampikon 139 pb sedangkan primer *E. coli* mampu mengamplifikasi fragmen gen *fim-C* *E. coli* menghasilkan panjang ampikon 121 pb.

B. Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji spesifisitas dan sensitivitas primer agar diperoleh data yang relevan sehingga pasangan primer dapat diaplikasikan untuk mendeteksi *foodborne pathogen* pada sampel makanan yang terkontaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, N. 2013. Uji *Salmonella-Shigella* pada Telur Ayam yang disimpan pada Suhu dan Waktu yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Edu Research* Vol. 2 No. 1 Hal 35-46.
- Astuti, T. P. 2016. *Macam-macam Struktur Sel Bakteri dan Fungsinya*. [Tugas I] Program Diploma III Analisis Kesehatan Fakultas Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang Hal 1-7.
- BioResource. 2014. *Ethanol Precipitation of DNA*. <https://www.youtube.com/watch?v=hnt6CfXXz9s> diakses tanggal 6 Desember 2016 pukul 09:51 WIB.
- Budiarso, T. Y., Belo, M. J. X. 2009. Deteksi Cemaran *Salmonella sp.* pada Daging Ayam yang dijual di Pasar Tradisional di Wilayah Kota Yogyakarta. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta* Halaman 245-251.
- Crim, S. M., Griffin, Patricia M., Tauxe, R., Marder, Ellyn P., Gillis, D., Cronquist, Alicia B., Carterr M., Tobin, M., Blythe D., Smith, K., Lathrop, S., Zansky, S., Dunn, J., Holt, K., Wolpert, B., Henao, L. 2015. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – Foodborne Disease Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2014. *Centers for Disease Control and Prevention*. Vol 64 No 18 page 495-499.
- Damianus, 2008. *Salmonella typhimurium* <https://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/salmonella-typhimurium1.pdf> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 12:45 WIB.
- Drew, F. 2010. *1.636.000 Pounds of Beef Recalled since November due E. coli O157:H7*. <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/1636000-pounds-of-beef-recalled-since-november-due-to-e-coli-o157h7/#.VUA1vSZMRYx> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 12:49 WIB.
- Donohue, T. M., and Osna, N. A. 2004. *Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury*. <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/317-324.htm> diakses tanggal 13 Agustus 2016 pukul 6:41 WIB.
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik Jilid II*. Jakarta: Penerbit Erlangga.

- Genome Research. 2016. *What is the Gel Electrophoresis?*. <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis?> diakses tanggal 2 Februari 2017 pukul 13:39 WIB.
- Hazar, M., Salim, M., Mardiah E. 2011. *Keberadaan Escherichia coli Resistan Antibiotik pada Ikan Balang (Pristolepis fasciata) di Sungai Batangarau*. <http://repository.unand.ac.id/20434/1/jurnal%20penelitian.pdf> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 13:08 WIB.
- Herden. 2014. *Blotting/Hybridization Techniques*. <http://www.afrivip.org/education/health-management-tools/laboratory-diagnostics-molecular/molecular-blotting/2014/highlights> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 13:26 WIB.
- Hutagaol, S., Fitri, Y., Mulyani, N. 2012. *Praktikum Isolasi DNA dan Teknik PCR*. http://www.openwetware.org/images/7/78/Laporan_5,6,7.pdf diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 13:31 WIB.
- Hutchins and Kolodka. 2014. *Isolation, Purification, Concentration and Quantitation of DNA and RNA*. Calgary: University of Calgary.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White T. J. 1990. *PCR Protocol : A Guide to Method and Application*. Academic Press, Inc : California.
- Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., Fukui, K. 2007. Genome-Wide Screening of Genes Required for Swarming Motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. Vol. 189 No. 3 page 950-957.
- Kartika, I. R., Kurniadewi, F., Ardiyanto T., Muktiningsih. 2011. Uji Klinis Pasangan Primer Gen *fimc* *Salmonella typhi* dengan Ukuran 0.2 Kilo Basa sebagai Alat Deteksi Bakteri Penyebab Penyakit Typhus pada Manusia. *BLU FMIPA UNJ Dengan Nomor Kontrak: 294 D.14/SPK Penelitian/6.FMIPA/2011.Tanggal : 29 JULI 2011*.
- Kazuko, A. 2001. *PCR in Molecular Biology Problem Solver a Laboratory Guide*. Willey Liss.
- Khan Academy. 2016. *Discovery of the structure of DNA*. <https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/discovery-of-the-structure-of-dna> diakses tanggal 18 Januari 2017 pukul 15:43 WIB.

- Konietzny, U., and Greiner, R. 2003. The Application of PCR in The Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 34, No. 4, page 283-300.
- Kusuma, S. 2010. PCR. <http://docplayer.info/32825565-Makalah-pcr-oleh-sri-agung-fitri-kusuma-m-si-apt.html> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 14:09 WIB.
- Lestario, D. 2015. *Real-time PCR Roche: Aplikasi Quantitative dan Qualitative dari real-time PCR & Lab Development Test*. Roche Presentation FK UNPAD Biomedik.
- LifeCo Scientific. 2017. *Nucleid Acid Isolation Kit*. <http://www.lifecoscientific.com/nucleic-acid-purification-kits.html> diakses tanggal 19 Januari 2017 pukul 06:35 WIB.
- Lubis, P. A. H. 2015. *Identifikasi Bakteri Escherichia coli serta Salmonella sp. yang Diisolasi dari Soto Ayam*. [file:///C:/Users/Wsofihan/Downloads/PUTRI%20AULIYA%20HILFA%20LUBIS-FKIK%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Wsofihan/Downloads/PUTRI%20AULIYA%20HILFA%20LUBIS-FKIK%20(1).pdf) diakses tanggal 31 Januari 2017 pukul 12:47 WIB.
- Ludyasari, A. 2013. *Pengaruh Suhu Annealing pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (Metapenaeus elegans De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah*. <http://etheses.uin-malang.ac.id/2540/> diakses tanggal 31 Januari 2017 pukul 13:52 WIB.
- Malorny, B. 2013 *Diagnostic Real-time PCR for Detection of Salmonella in Food and Characterization of Epidemiologically Important Salmonella enterica subsp. Enterica serovars Isolated from Livestock , Food and Humans*. Berlin: Universitat Berlin.
- Molecular Biology. 2017. *The structure of DNA*. <http://archive.cnx.org/contents/20f982f3-6744-49c3-9d18-e84a1241305e@1/molecular-biology-the-structure-of-dna> diakses tanggal 19 Januari 2017 pukul 07:01 WIB.
- Mortimer, P. S. 1981. *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. <http://www.springer.com/la/book/9783662131879> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 15:09 WIB.
- Muktiningsih, Kurniadewi, F., Sukmawati, D. 2010. Pengembangan Metode Deteksi Bakteri Penyebab Penyakit Typhus pada Manusia dengan Polymerase Chain Reaction. *Laporan penelitian Hibah Kompetisi Lemlit UNJ. No. 20/SPK/PP/LP UNJ/DIPA-PNBP/K-2009* tanggal 31 Desember 2010.

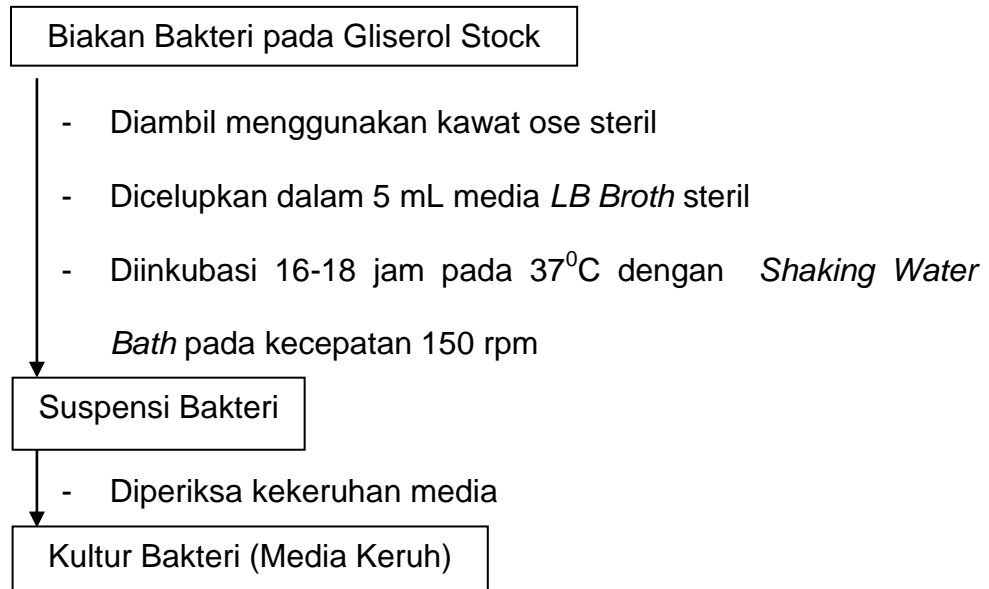
- Muktiningsih, Yoni, F., Syukriani, Kartika, I. R., Murni S, Catur D. A. 2009. The Fuction of Salmonella Typhi Reference Spot Bacteria With Molecular Weight 46.7 Kilodalton and Isoelectric Point 6.7. *Proc. The first International Seminar on Science and Technology, UII-UKM-UMT*, 24-25 January. Jogjakarta- Indonesia
- NCBI. 2016. *National Center for Biotechnology Information. US National Library of Medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> diakses tanggal 4 Februari 2016 pukul 07:WIB.
- O'Connell, J. 2002. *Methods in Molecular Biology: RT-PCR Protocol*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Pambudiono, A., Suarsini, E., Amin, M. 2016. Isolasi DNA Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium dari Limbah Cair Penepungan Agar. *Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek ISSN: 2557-533X* Hal 103-107.
- Perna, N. T., Plunket, G., Bloch, C. A., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rose, C. K., Mayhew, J. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y., Blattner, F. R. 2001. Genome Sequence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* Vol 409 page 529-533.
- Pochop, J., Kacaniova, M., Hleba, L., Lopasovsky, L., Rovna K., Arpasova H. 2012. Aplication of Real-time PCR for Rapid Detection of Salmonella spp., Salmonella enterica ser. Typhimurium and Enteritidis in Food Sampel of Animal Origin without Pre-enrichment and with Pre-enrichment. *Scientific Paper : Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 45 No. 1 page 341-345.
- Prayoga, W., Wardani, A. K. 2015. PCR untuk Deteksi *Salmonella* sp. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No. 2 Hal. 483-488.
- Premier Biosoft. 2016. *In Silico Design of Taqman Probes Design with Beacon Designer and AlleleID*. <http://www.premierbiosoft.com/tech-notes/taqman.html> diakses tanggal 3 Februari 2016 pukul 10:50 WIB.
- Radji, M., Puspaningrum, A., dan Sumiati, A. 2010. Deteksi Cepat Bakteri *Escherichia coli* dalam Sampel Air dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* Menggunakan *Primer 16E1* dan *16E2*. *Jurnal Makara Sains* Vol. 14 No. 1 Hal. 39-43.
- Rotger, R and Casadesus, J. 1999. The Virulence Plasmid of *Salmonella*. *International Microbiol* Vol. 2 Page 177-184.

- Sanger Institute. 2016. *Salmonella spp. Comparative Sequencing Project*. <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/salmonella.html> diakses tanggal 13 Agustus 2016 pukul 23:40 WIB.
- Santos, C.F., Sakai, V.T., Machado, M.A.A.M., Schippers, D.N., Greene, A.S. 2004. *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction: Principles and Application in Dentistry*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365144> diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 15:58 WIB.
- Schmid. 2003. *Principle and Tools of the Silica Spin Column Technology*. <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab11-Biol210.htm> diakses tanggal 19 Januari 2017 pukul 07:09 WIB.
- Sigma. 2017. *Lipopolysaccharides: Function and Application*. Sigma Life Science page 27-29.
- Thermoscientific. 2008. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermoscientific. 2013. *Product Information Thermo Scientific DreamTaq PCR Master Mix (2x)*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermoscientific. 2014. *Product Information GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. Thermo Fischer Scientific Inc.
- Todar, K. 2012. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Salmonella, diakses tanggal 4 Februari 2017 pukul 16:15 WIB.
- Tolosa, J. M., Schjenken, J. E., Civiti, T. D., Clifton, V. L., Smith, Roger,. 2007. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and Protein from the same sample. *Biotechniques*, Vol. 43 No 6 page 799-804.
- Vicki, C. 2008. *Detergent Properties and Applications*. <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biofiles/detergent-properties.html> diakses tanggal 2 Februari 2017 pukul 10:32 WIB.
- What When How. 2017. *Ethidium Bromide (Molecular Biology)*. <http://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/> diakses tanggal 2 Februari 2017 pukul 13:29 WIB.

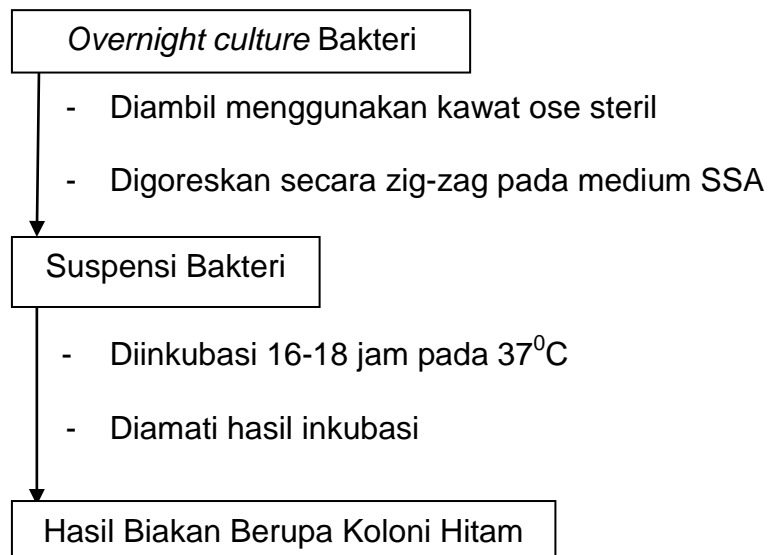
LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja

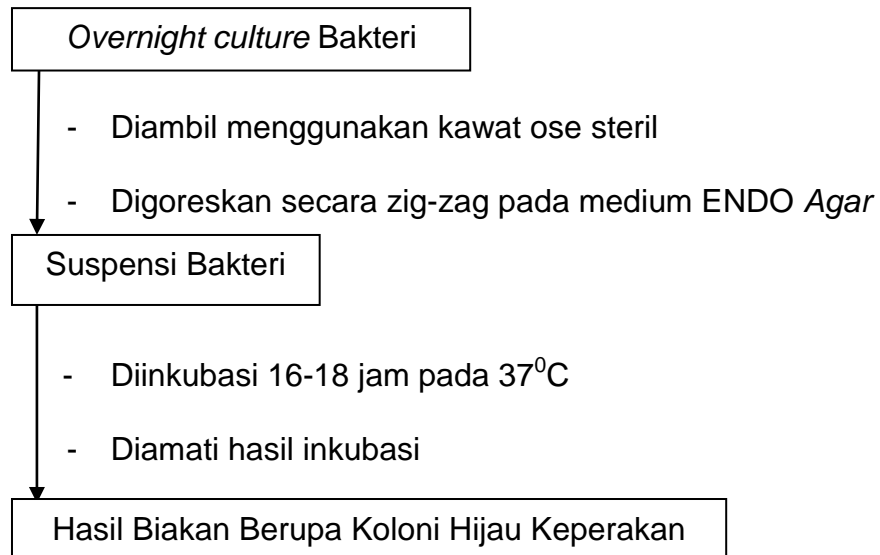
1.1 Pemiakkan Bakteri pada Media *LB Broth*



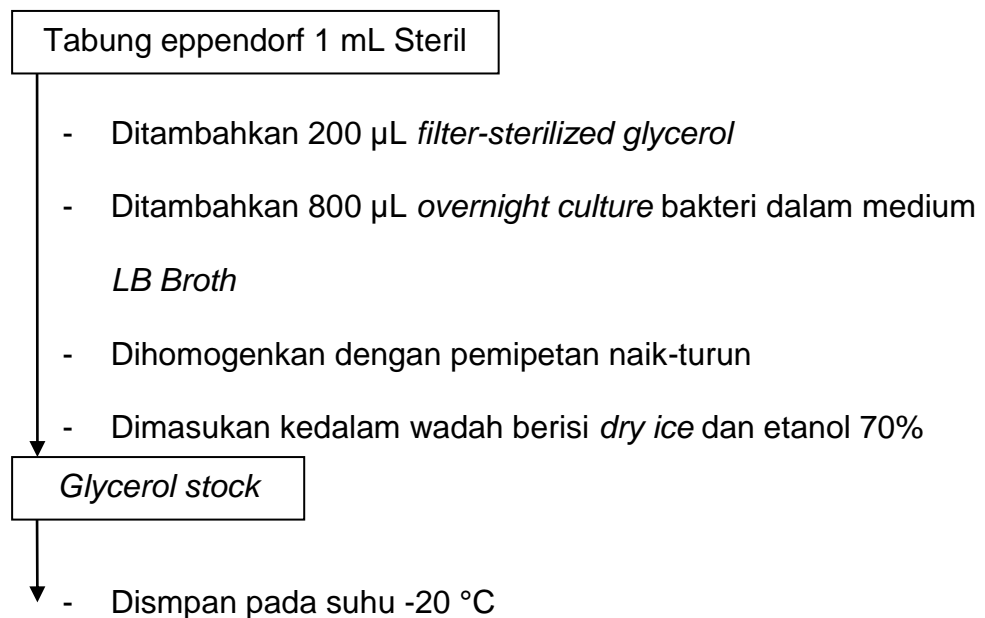
1.2 Pemiakkan Bakteri *Salmonella typhimirium* pada Media (SSA)



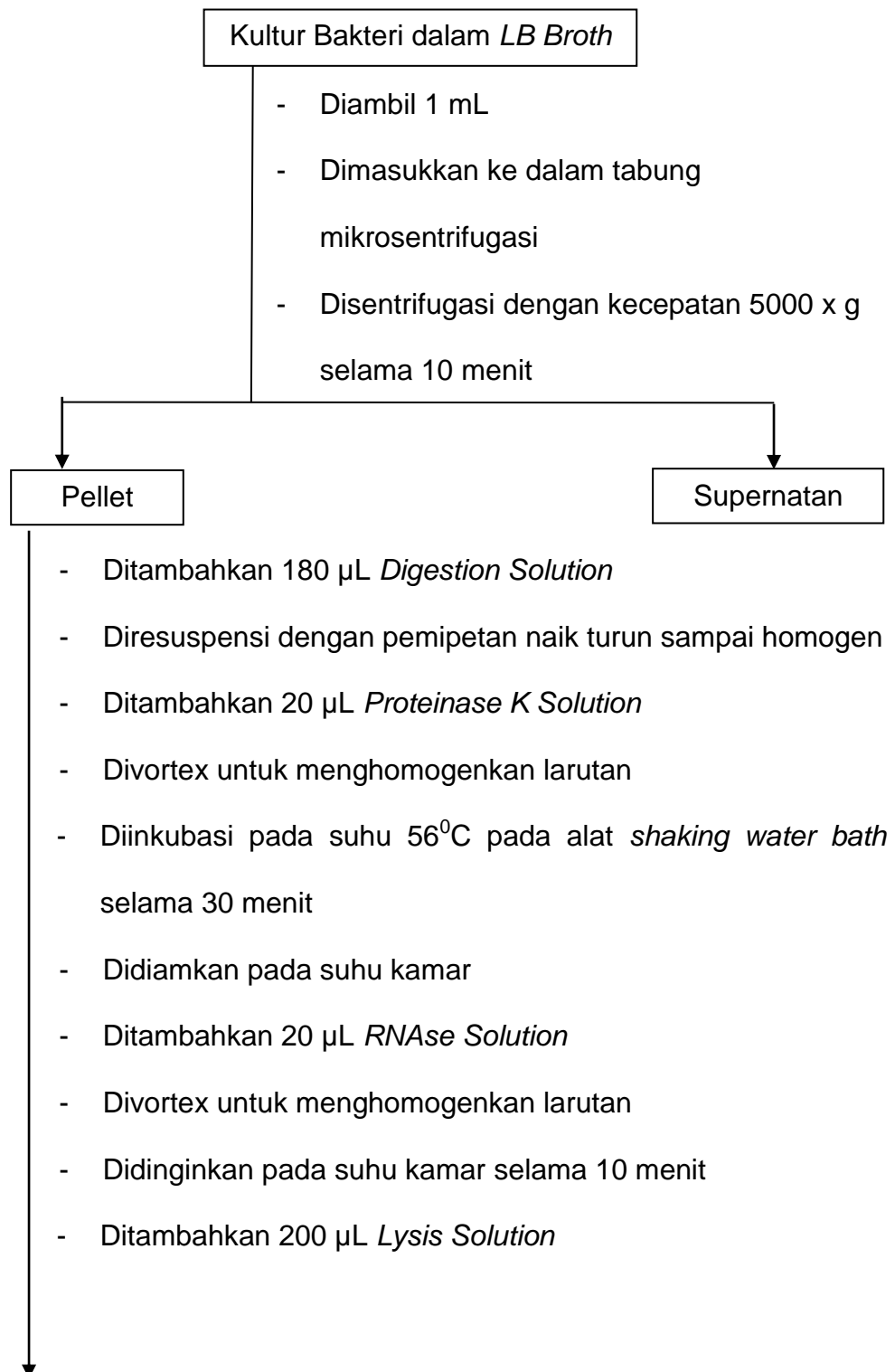
1.3 Pemiakkan Bakteri *Escherichia coli* pada Media ENDO Agar



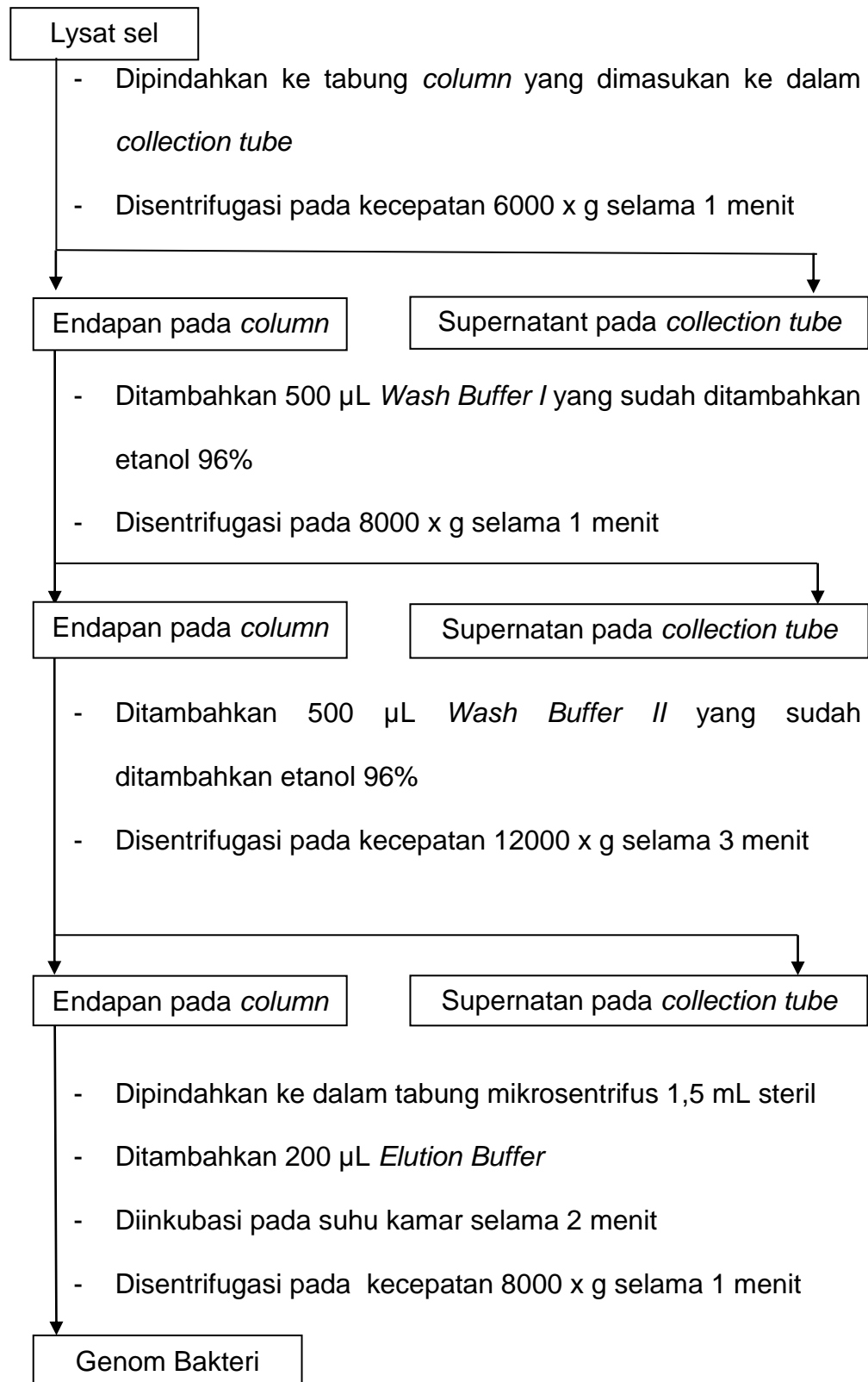
1.4 Pembuatan *Glycerol Stock*



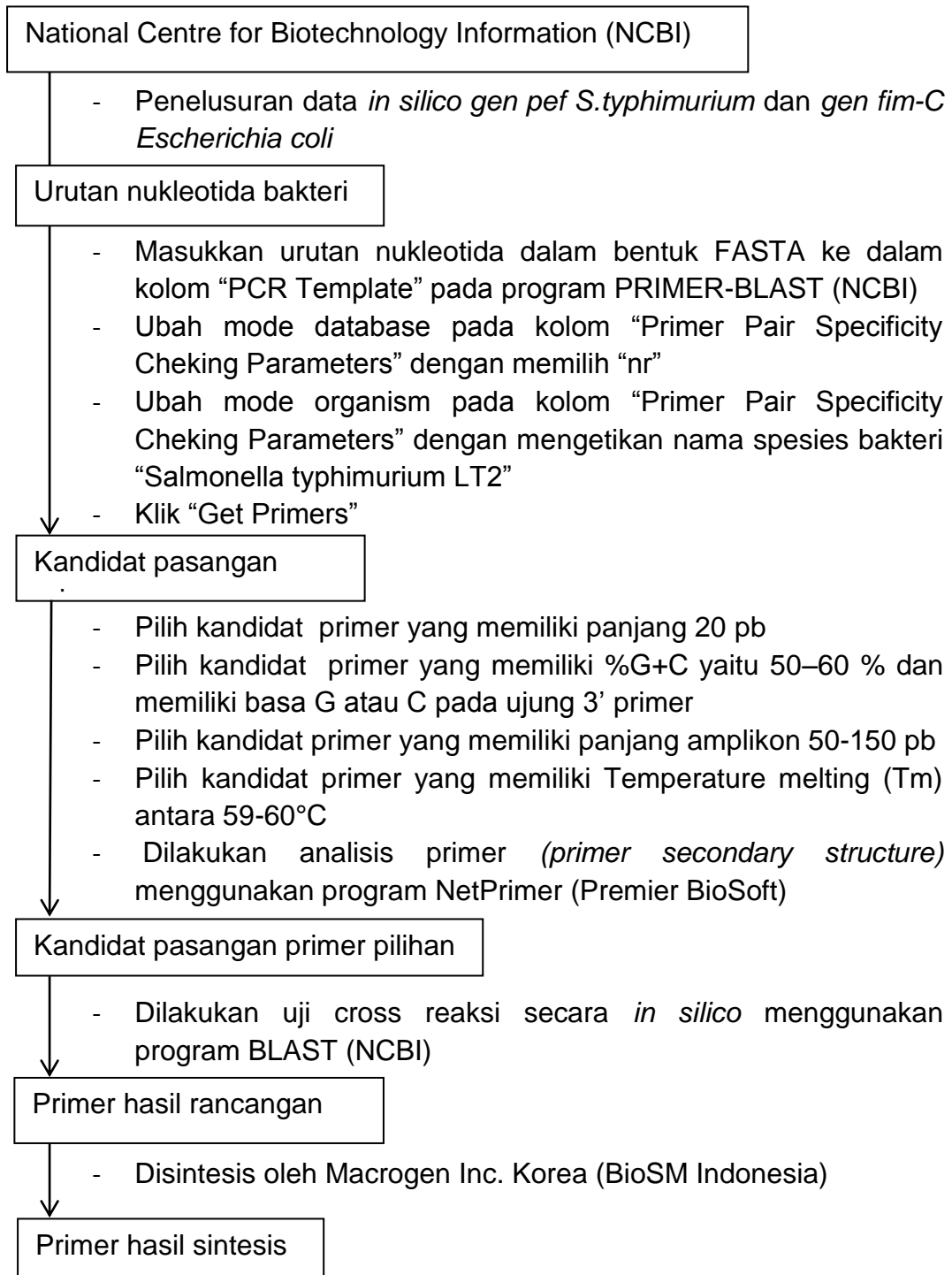
**2. Isolasi Genom Bakteri dari biakan murni menggunakan
GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)**



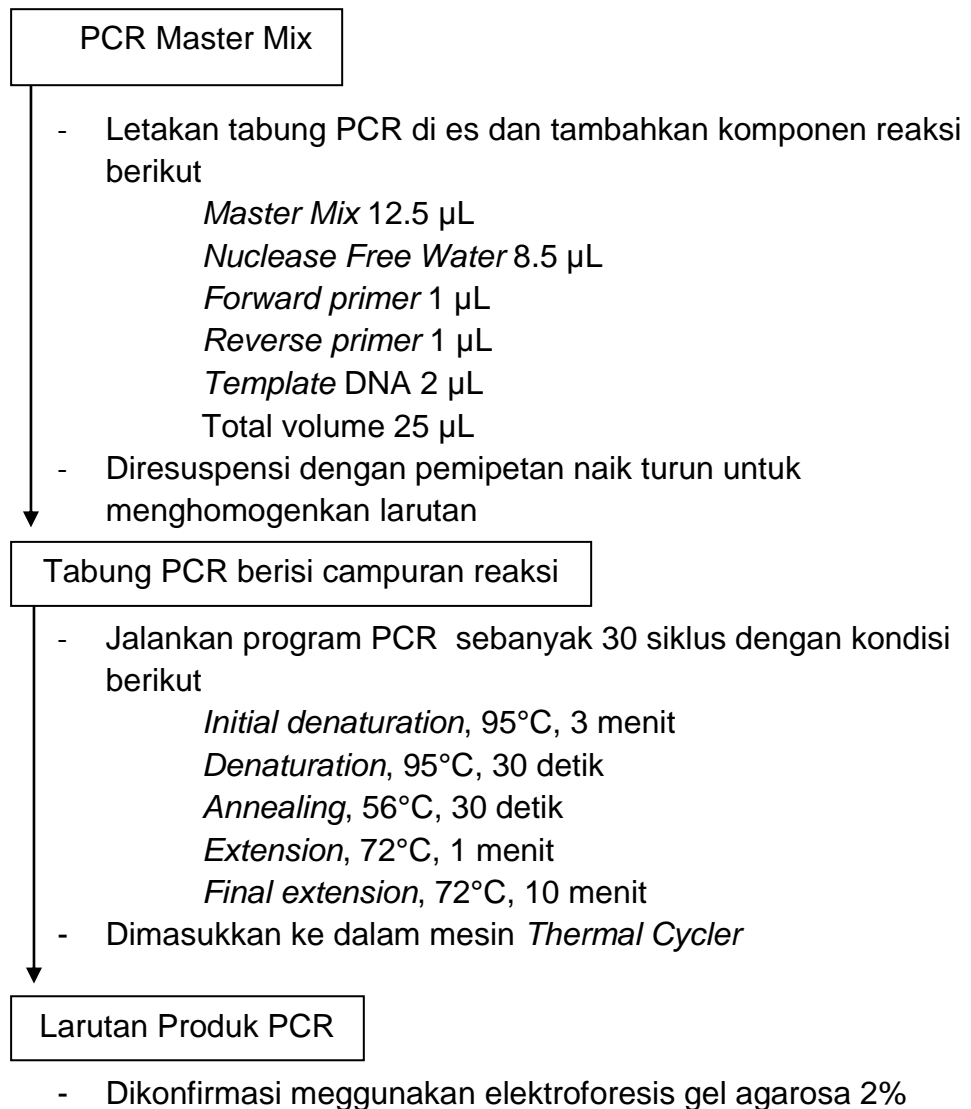
- Divortex selama 15 detik untuk menghomogenkan larutan
- Ditambahkan 400 μ L Etanol 50%



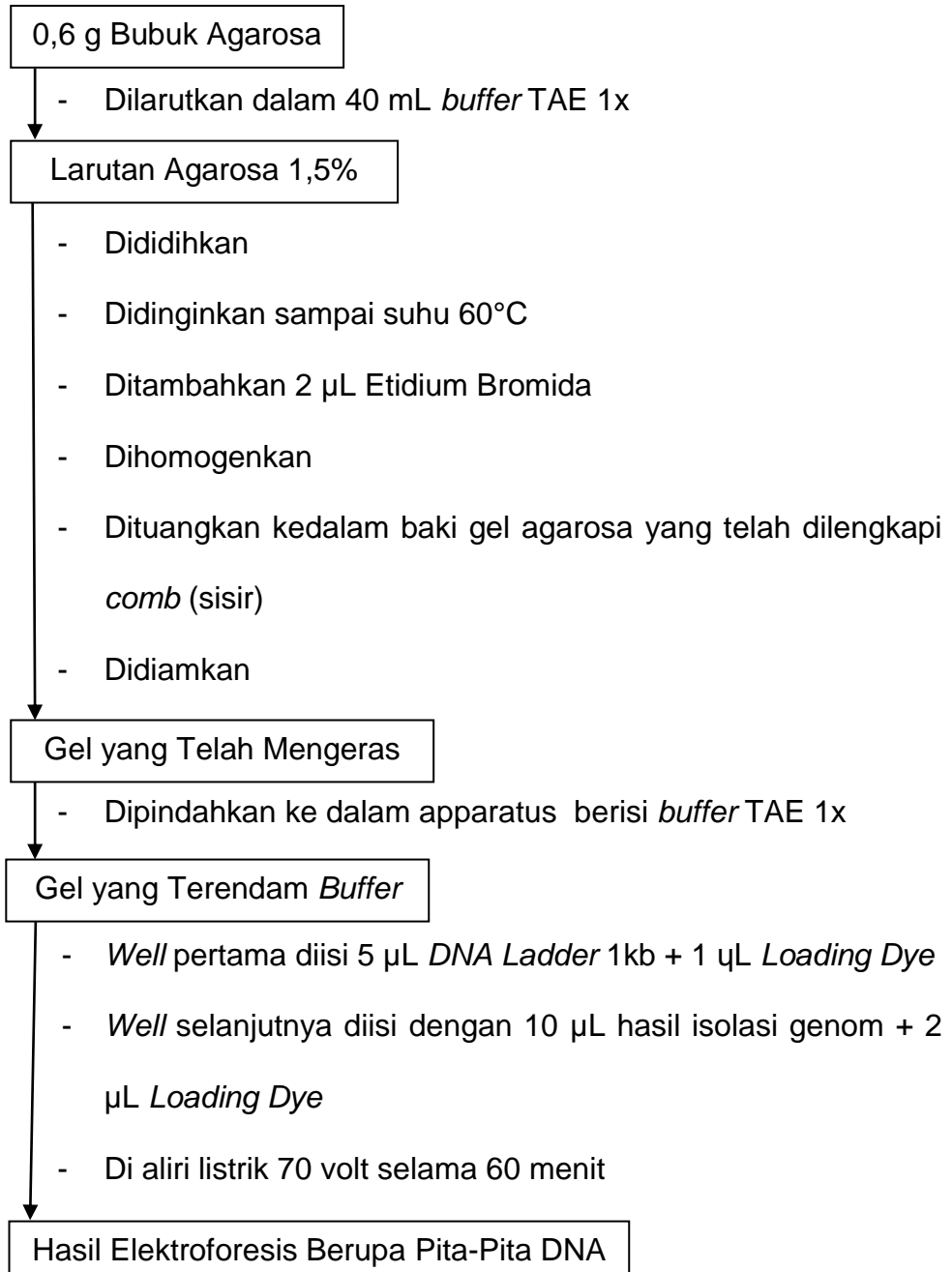
3. Perancangan Primer



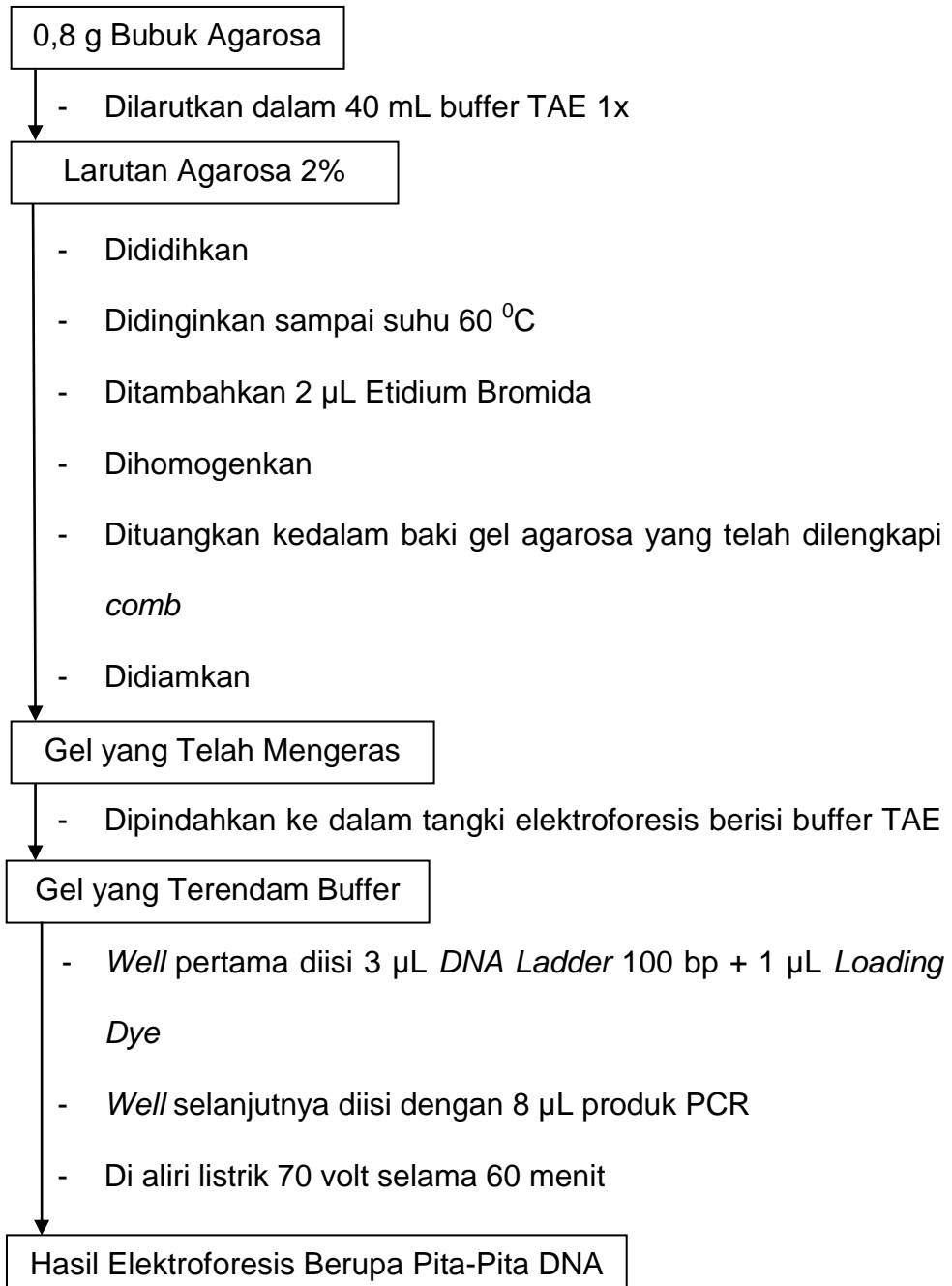
4. Amplifikasi DNA bakteri dengan metode PCR



5. Pembuatan Gel Agarosa 1,5% dan Tahapan Elektroforesis



6. Pembuatan Gel Agarosa 2% dan Proses Elektroforesis



Lampiran 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

=====dsDNA=====				
Date 2016/08/02				
Time 12:15:16				
=====				
Date 2016/08/02 12:12:53				
=====				
Hasil isolasi DNA 28/S menggunakan Kit Thermo Scientific	sample_1: <i>S. typhi</i>	A230	A260	A280
		0.257	0.432	0.221
		A260/A230	A260/A280	
		1.679	1.953	
		Conc. 21.61 (ng/uL) x 200 uL		
		= 4.322 ng		
	sample_2: <i>S. typhimurium</i>	A230	A260	A280
		0.211	0.380	0.193
		A260/A230	A260/A280	
		1.799	1.967	
		Conc. 18.98 (ng/uL) x 200 uL		
		= 3.796 ng		
	sample_3: <i>Shigella</i>	A230	A260	A280
		1.493	1.374	0.899
		A260/A230	A260/A280	
		0.920	1.529	
	Conc. 68.70 (ng/uL) x 200 uL			
	= 13.740 ng			
sample_4: <i>E. coli</i>	A230	A260	A280	
	0.250	0.300	0.151	
	A260/A230	A260/A280		
	1.200	1.989		
	Conc. 15.01 (ng/uL) x 200 uL			
	= 3.002 ng			
=====				
Date 2016/08/02				
Time 12:33:43				
=====				
Date 2016/08/02 12:30:57				
=====				
Hasil isolasi DNA 20/7 menggunakan Kit Thermo	sample_1: <i>S. typhi</i> ①	A230	A260	A280
		0.839	1.105	0.572
		A260/A230	A260/A280	
		1.317	1.933	
		Conc. 55.26 (ng/uL)		
	sample_2: <i>S. typhi</i> ②	A230	A260	A280
		0.867	1.129	0.665
		A260/A230	A260/A280	
		1.302	1.698	
		Conc. 56.44 (ng/uL)		
	sample_3: <i>S. typhimurium</i>	A230	A260	A280
		0.305	0.582	0.290
		A260/A230	A260/A280	
		1.905	2.009	
		Conc. 29.08 (ng/uL)		

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Winda Sofihan

Nomor Registrasi : 3325120252

Program Studi : Kimia

menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *pef Salmonella typhimurium* dan Gen *fim-C Escherichia coli***" adalah:

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian pada bulan Januari 2016 s.d Desember 2016.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, 13 Februari 2017

Yang membuat pernyataan,



DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Winda Sofihan. Lahir di Jakarta pada tanggal 8 April 1995. Anak tunggal dari pasangan Dadang Sopihan dan Nurhayati. Memiliki semangat yang tinggi, *goal oriented*, serta antusiasme terhadap hal dan tantangan baru. Penulis menyelesaikan pendidikan formal di SD Negeri

Cibalongsari IV pada tahun 2001-2006, SMP Negeri 1 Klari pada tahun 2006-2009, SMA Negeri 1 Klari, Karawang pada tahun 2009-2012, dan diterima di program studi Kimia FMIPA Universitas Negeri Jakarta pada tahun 2012 melalui jalur SNMPTN undangan.

Selama perkuliahan penulis aktif dalam kegiatan organisasi di Departemen Pengembangan Profesi Keilmiah dan Akademik (P2KA) BEMJ Kimia UNJ dan Departemen Kewirausahaan BEMF MIPA UNJ. Penulis pernah melakukan kunjungan ke beberapa industri, seperti PT. Niramas Utama (INACO), PT. Coca Cola Amatil Indonesia, PT. Amerta Indah Otsuka (Pocari Sweat), PT. Yakult Indonesia Persada, PT. Sidomuncul, dan Pabrik Carica – Dieng, Wonosobo. Penulis juga pernah melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sukamulya, Subang. Selain itu penulis pernah menjadi asisten dosen Praktikum Termodinamika dan Praktikum Mikrobiologi. Penghargaan yang pernah diterima oleh penulis selama kuliah yaitu penerima Hibah Dana Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) DIKTI tahun 2014 dalam bidang Kewirausahaan dan grand Finalis Pekan Ilmiah Mahasiswa Universitas Negeri Jakarta tahun 2016.

