

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Keracunan makanan adalah istilah penyakit yang disebabkan karena infeksi bakteri, virus, parasit, atau racun dari kuman yang mengkontaminasi makanan. Keracunan makanan yang disebabkan bakteri *foodborne pathogen* dikenal dengan *Foodborne disease* (Taylor, 2017). Bakteri *foodborne pathogen* adalah bakteri yang merugikan manusia, salah satu contoh bakteri *pathogen* adalah *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Bakteri tersebut termasuk dalam 31 jenis bakteri yang sering ditemukan dalam kasus keracunan makanan (Priyanka *et al*, 2016).

Laporan dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) menyatakan pada bulan Juli sampai dengan September 2016 terdapat 26 insiden keracunan yang terjadi di Indonesia. Sebanyak 25 insiden keracunan disebabkan oleh makanan dan minuman yang dikonsumsi telah tercemar oleh mikroba dan satu insiden lainnya akibat racun alam (BPOM, 2016). Banyaknya kasus keracunan yang terjadi pada masyarakat yang diakibatkan oleh mikroba *pathogen* menyebabkan diperlukannya pengembangan metode deteksi patogen yang cepat, akurat, dan sensitif terhadap *pathogen* tersebut.

Metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* dapat menjadi metode alternatif untuk mendeteksi *foodborne pathogen*. Metode ini merupakan pengembangan dari metode *Polymerase Chain Reaction* yaitu suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Metode *real-time* PCR dinyatakan memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dibanding dengan metode PCR konvensional dan membutuhkan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan metode tradisional atau metode kultur (Mokhtari, W *et al.*, 2013). Metode *real-time* PCR membutuhkan sepasang primer dari DNA target yang akan diamplifikasi dalam pengujian. Pasangan primer *forward* dan *reverse* digunakan sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Dorak, 2006).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Muktiningsih *et al.*, 2017 bekerjasama dengan Lembaga Mitra Laboratorium Forensik MABES POLRI Kalimantan telah berhasil merancang pasangan primer gen *fim-C* untuk bakteri *Salmonella typhi*. Pasangan primer gen *fim-C* telah berhasil mengamplifikasi DNA bakteri *Salmonella typhi* pada ukuran 95 pb dengan metode PCR konvensional. Namun pasangan primer tersebut belum diketahui tingkat sensitivitas dan spesifisitasnya terhadap DNA bakteri yang digunakan. Pengujian sensitivitas dilihat dari konsentrasi terendah dari DNA genom yang masih dapat menghasilkan pita DNA yang sesuai dengan panjang ampikon dan terlihat jelas pada elektroforesis gel. Sementara spesifisitas adalah kemampuan suatu pasangan primer yang hanya mengenali satu genom spesifik (Dorak, 2006).

Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan pengujian sensitivitas dan spesifisitas pasangan primer gen *fim-C* untuk bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan metode *real-time* PCR.

B. Perumusan Masalah

Masalah yang dikaji dalam penelitian ini adalah “Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas primer gen *fim-C* 95 pb pada bakteri *Salmonella typhi* dan primer gen *fim-C* 153 pb bakteri *Sigella dysenteriae* menggunakan metode *real-time* PCR?”

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data sensitivitas dan spesifisitas pasangan primer gen *fim-C* 95 pb bakteri *Salmonella typhi* dan primer *fim-C* 153 pb bakteri *Sigella dysenteriae* menggunakan metode *real-time* PCR.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini ialah memberikan informasi sensitivitas dan spesifisitas pasangan primer gen *fim-C* 95 pb bakteri *Salmonella typhi* dan primer gen *fim-C* 153 pb bakteri *Shigella dysenteriae* menggunakan metode *real-time* PCR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri *Salmonella typhi*

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri patogen yang tergolong dalam spesies *Salmonella enterica* dari keluarga *Enterobacteriaceae*. Gambar 1 merupakan bakteri *Salmonella typhi*, sementara taksonomi bakteri *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: <i>Eurobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella enterica</i>
Serotipe	: <i>typhi</i>



Gambar 1. Bakteri *Salmonella typhi* (Todar, 2012).

Bakteri *Salmonella typhi* memiliki ukuran 0,7 - 1,5 μm dan tidak berspora, koloni yang dihasilkan bakteri ini berdiameter 2 – 4 mm. Bakteri ini dapat hidup dalam lingkungan alam seperti, tanaman, air, dan tanah yang dipengaruhi oleh

kelembaban, pH, dan suhu yang sesuai, tetapi tidak tumbuh secara signifikan. Sel inang dari bakteri *Salmonella typhi* adalah manusia dan hewan berdarah panas. Bakteri ini menyebabkan penyakit tipes dan *gastroenteritis* (keracunan makanan) pada manusia setelah mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri tersebut (Liu, 2010).

Bakteri *Salmonella typhi* memiliki protein Fimbrial-C atau Fim-C dan fungsinya ditemukan melalui pendekatan proteomik yaitu sebagai alat untuk melekatkan diri pada inangnya dan cenderung melekat pada permukaan usus manusia. Berdasarkan fungsinya menghasilkan protein permukaan maka gen ini dijadikan target dalam mendeteksi bakteri dan dalam pengembangannya sebagai alat deteksi tingkat genomik. Telah berhasil diisolasi DNA bakteri *Salmonella typhi*, dan *Shigella dysenteriae* dan dideteksi dengan menggunakan primer gen *fim-C* pada kedua bakteri tersebut dengan metode PCR (Nurkhasanah, 2017).

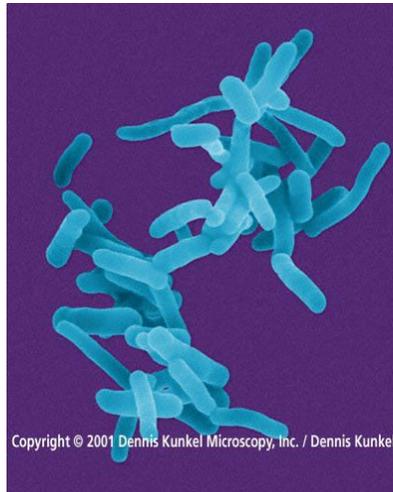
Salmonella typhi tumbuh baik pada media padat selektif *Salmonella Shigella Agar (SSA)*. Optimalisasi pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dilakukan pada suhu 37°C selama 16 - 18 jam inkubasi. Koloni yang terbentuk dari bakteri *Salmonella typhi* adalah koloni tidak berwarna dengan bagian tengah hitam di atas permukaan media (HiMedia, 2015).

B. Bakteri *Shigella dysenteriae*

Bakteri *Shigella dysenteriae* juga merupakan bakteri patogen penyebab *shigellosis* yang merupakan penyakit diare. Gambar 2 merupakan bakteri *Shigella dysenteriae*, sementara taksonominya adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Shigella</i>

Spesies : *Shigella dysenteriae*



Gambar 2. Bakteri *Shigella dysenteriae* (Kunkel, 2001)

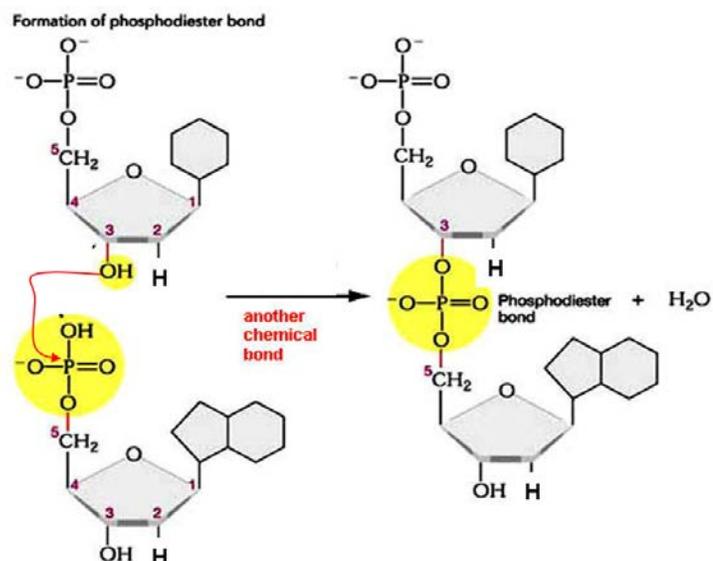
Shigella dysenteriae adalah bakteri gram negatif yang berbentuk basil dan lurus, tidak memiliki flagel, fakultatif anaerob, tidak berspora, tidak berkapsul, dapat tumbuh baik pada suhu 37°C, salah satu kelompok *Enterobacteriaceae*, berukuran sekitar 2 - 3 µm x 0,5 - 0,7 µm dan memiliki susunan yang tidak teratur (Kunkel, 2001). Koloni *Shigella dysenteriae* berbentuk bulat, transparan dengan pinggir utuh dan berukuran mencapai 2 mm (HiMedia, 2015).

Shigella dysenteriae merupakan bakteri patogen penyebab *shigellosis* yaitu penyakit disentri yang ditandai dengan diare disertai darah. *Shigellosis* adalah salah satu penyakit serius dengan angka kematian yang tinggi dan biasanya terjadi dalam penangkaran primata. Batas dosis minimal infeksi *Shigella* sangat rendah yaitu 10² bakteri yang dapat menyebabkan wabah infeksi pada primata dewasa dan manusia sehingga manusia akan sangat mudah terserang penyakit disentri mengingat dosis infeksinya yang rendah (Rahmi, Erdiansyah *et al*, 2014; Fowler dan Miller, 2003).

C. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

Deoxyribonucleic Acid (DNA) adalah suatu materi yang terdapat pada tubuh manusia dan makhluk hidup yang diwarisi secara turun temurun. DNA terdapat pada nukleus dan sebagian kecil dapat ditemukan di mitokondria (Ngili Yohanis, 2010).

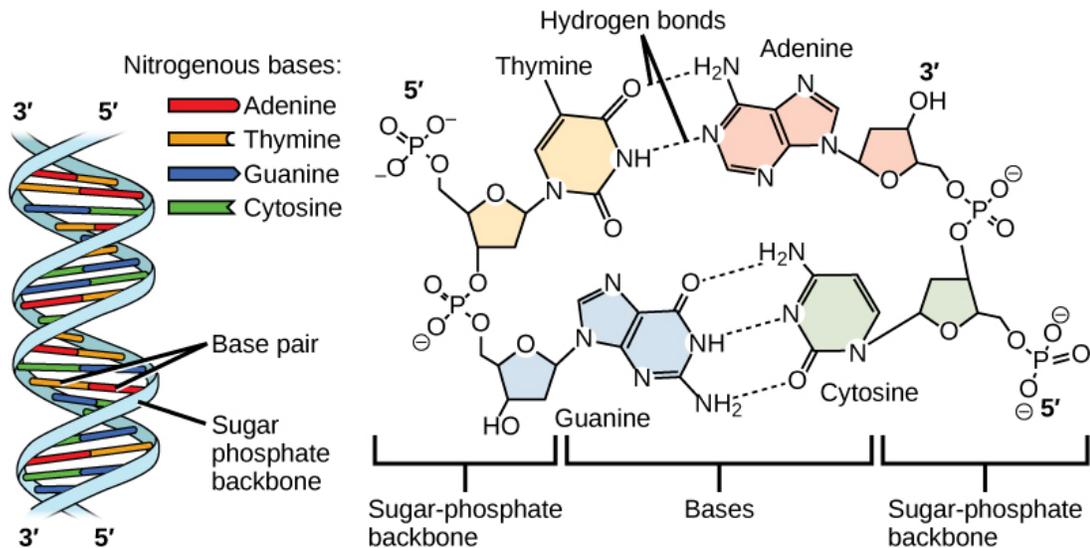
Jika ditinjau dari ilmu kimia, DNA merupakan polinukleotida, yaitu polimer dari tipe nukleotida (sebagai satuan DNA yang berulang). Nukleotida yang satu dengan nukleotida yang lain saling berikatan fosfodiester antara karbon 3' pada satu nukleotida dengan karbon 5' pada nukleotida setelahnya. Nukleotida yang merupakan satuan dari DNA mengandung tiga komponen yang khas yaitu : basa nitrogen, pentosa, dan asam fosfat. Basa nitrogen terdiri dari dua macam yaitu pirimidin dan purin. Sementara basa purin masih terbagi 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. Basa nitrogen bergabung secara kovalen dalam ikatan N-glikosil dengan atom karbon 1' pada pentosa dan asam fosfat berikatan ester dengan atom karbon 5' ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur nukleotida berikatan fosfodiester (Madigan *et al*, 2011).

DNA merupakan molekul rangkap, yakni dua rantai atau dua untai polinukleotida dihubungkan satu sama lain melalui pasangan basa nitrogen. Pasangan basa yang berikatan adalah dari basa nukleotida yang telah dijelaskan di atas. Keempat basa tersebut saling komplementer dimana adenin berpasangan dengan timin sementara guanin dengan sitosin. Pasangan – pasangan basa dihubungkan oleh ikatan hidrogen antara dua untai DNA yang membentuk untai heliks atau *double*

heliks. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara basa ditunjukkan dengan garis putus – putus dalam gambar 4. Komplementer adenin dan timin membentuk dua ikatan hidrogen, sementara guanin dan sitosin membentuk tiga ikatan hidrogen.



Gambar 4. Struktur DNA *double heliks* dan ikatan hidrogen (Molecular Biology, 2017).

Heliks DNA distabilkan oleh ikatan hidrogen antara pasang – pasang basa individu dan oleh gaya hidrofob antara pasangan basa yang bertumpuk. Pereaksi yang bisa mereduksi ikatan hidrogen serta menurunkan polaritas medium yang mengelilinginya akan menyebabkan denaturasi, contohnya adalah pereaksi formamida. pH ekstrim yang memberi muatan pada basa juga efektif untuk mendenaturasi DNA. Oleh karena itu pada pH 12 DNA menunjukkan absorpsi (pada 260 nm) 40 % lebih tinggi dari pada bentuk aslinya (Ngili Yohanis, 2010).

DNA yang memiliki fungsional utama disebut gen, jadi gen merupakan DNA yang menentukan spesifikasi suatu sifat tertentu. Sifat – sifat tersebut dipengaruhi oleh urutan basa – basa komplementer yang menyusun nukleotida – nukleotida menjadi molekul besar DNA. Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* memiliki gen yang sama yaitu gen *fim-C*.

D. Gen *fim-C*

Gen *fim-C* merupakan gen yang mengkode protein *fimbrial* dengan ukuran 29 kDa. Gen ini termasuk dalam gen *fimbrial* tipe 1 dengan ukuran diameter 7 – 8 nm dan panjang 100 nm yang terdapat pada bagian pili dalam permukaan sel bakteri, yang sebagian besar bakterinya adalah bakteri gram negatif. Gambar 5 dan 6 merupakan urutan nukleotida gen *fim-C Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*, seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa gen merupakan DNA yang memiliki fungsi tertentu. Fungsi tertentu yang dipengaruhi dari urutan basa – basa nitrogen dalam nukleotida tersusun menjadi DNA. Gen *fim-C* berfungsi sebagai mediator penting terhadap interaksi bakteri terhadap sel inang serta invasi sel epitel pada sel inang (Wray dan Wray, 2000 dan Drahovska *et al.*, 2001).

ORIGIN

```

1 atgetgaata gtataaaatt aggatttatt gttcttctca ogttatttac ttegetgaac
61 gtacaggcgg cgggggggat tgcattagc gccacgcgtg ttatttatcc ctogcgggcg
121 aaacagaact ctctggcaat cagtaatagc gatactcaag aacgttaoct cgtcaatcca
181 tggatcgaaa ataacgctgg gcagaaagaa aaaaogttaa togttacgcc gcotttatcc
241 gtcagcgagc ccaaaagtga aaacacgctg cgtattatct acgcggggca accgctaccc
301 gaggatcggg agtctgtatt ctggatgaac gtgaaagcca tcccgctggg cgataaaagt
361 catattgaag gaaaaaacgt tetgcaactg gcgattctgt cgcgcaccca actggtctgt
421 cgtccggcga atttgcgcga gacgcgggaa gacgcgcgca ccttctgtgaa attttccgt
481 gtccgcaacc atctcaagat aaccaaccga tetgcttatt acctcaacct ggtcaatata
541 agcgtgggtg cgaaaaagat tgataacgtg atgatcgcgc caaaaagcga catgcaaat
601 cccttaccga ctggcgcgca gggcagcgtg acatttcaga ccgtcaatga ttacggcgca
661 ttgacgtcgg cgacaacagc cagtctcggg taa

```

Gambar 5. Urutan nukleotida gen *fim-C Salmonella typhi* (NCBI,2017).

ORIGIN

```

1 atggccttta gggttctgac catggcggta gacctgtgca gactgacaac gaggacaatg
61 aatgttaacg ctggccatga aagaacctca aaatcccgca ttatacatca gattcaacta
121 attagaggca tcaccgaaaa tgaaaaggga gagaaaagcg atgaatttct cgtcgcctg
181 ccgctatcc agcgaactgga gccaaaagcg acttcgcagg ttcggatcat gaaacaagcc
241 gccacgcgca aagtaccacc cgatcgcgaa tetctctttt actataacct gcgtgaaatt
301 ccgctgtcc cgggaagcag cgagggccat gcgatcctgc aagtcccgct ccaaaagtgc
361 attaaactat tetggcggcc cgcgcatta cgcaaaaaaa tggcgatcca tgttgagcaa
421 cagctacagg ttagccagca gaataaccag cttaccctga aaaaaccgac cggatactat
481 ctgactattg cctatcttgg ggggatgag aaaggcgtgc tgcctggctt taaaagcag
541 atggtgcgac cgttcagttc ggtcaccacc agcacgggca gctatagcgg caagcagttt
601 tatcttggct acatggaaga ctacggcgca ttgcgtatga acacgctctc ctgccagcgg
661 caatgcgcc tgcagccggt ggagaataaa aatga

```

Gambar 6. Urutan nukleotida gen *fim-C Shigella dysenteriae* (NCBI,2017).

E. Isolasi DNA Bakteri Biakan Murni

Isolasi DNA ialah ekstraksi DNA yang merupakan tahap awal dari proses rekayasa genetik, yaitu memisahkan DNA dari molekul – molekul seperti protein, RNA dan lain – lain. Isolasi DNA dapat dilakukan dengan teknik sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul sampel, dilakukan dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar tabung sentrifug dan sebaliknya. Substansi yang lebih ringan akan berada di atas tabung sentrifug (Faatih, 2009).

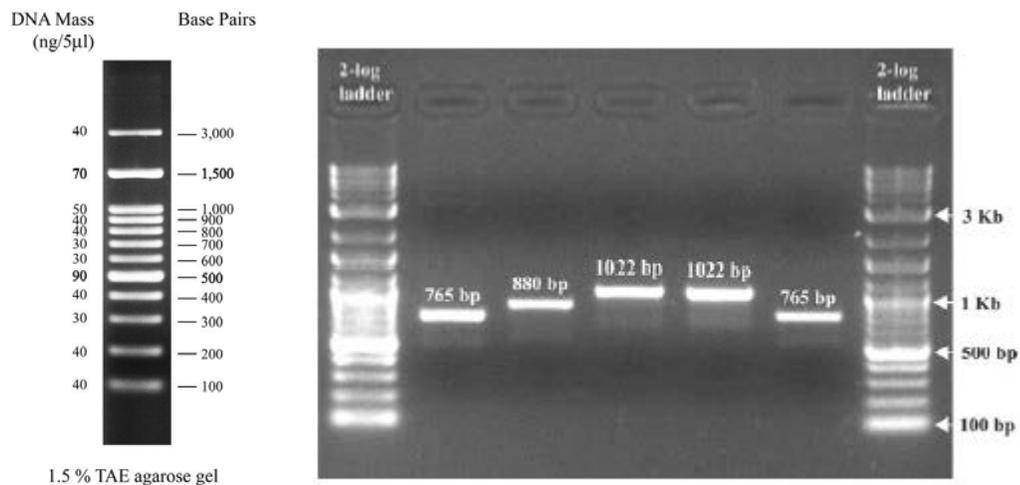
Terdapat empat tahapan dalam isolasi yaitu, proses lisis atau perusakan membrane sel, pengikatan, pencucian, dan elusi. Prinsip dalam proses lisis adalah penghancuran membran sel untuk mengeluarkan isi sel bakteri yang dapat dilakukan secara kimiawi dengan larutan detergen. Larutan detergen dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel yang menyebabkan struktur membran akan rusak dan melisiskan isi sel (Hutagaol *et al.*, 2012). Sementara dengan enzimatik dilakukan penambahan *proteinase K*. Enzim *proteinase K* berfungsi memutuskan ikatan peptida pada asam amino, sehingga protein akan rusak dan tidak lagi menyelimuti DNA dalam mitokondria dan akan memisah dengan DNA saat disentrifus menurut berat jenisnya (Donohue dan Osna, 2004).

Tahap pengikatan DNA, dimana larutan *buffer* yang ditambahkan pada sampel dengan penambahan etanol atau isopropanol akan membentuk ikatan dengan DNA. Tahap pencucian yaitu pencucian debris sel dan protein, molekul lainnya yang telah rusak akibat perusakan membran sel yang dilakukan dengan menambahkan *wash buffer*. Tahap terakhir adalah tahap elusi dilakukan dengan penambahan *buffer elusion* sehingga larutan DNA akan berkumpul pada dasar tabung. DNA yang diperoleh disimpan dalam suhu - 20°C (Irawan, 2014).

Pengujian hasil isolasi DNA dapat dilakukan dengan Nanodrop atau spektrofotometer UV- VIS pada perbandingan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, dimana perbandingan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat mengetahui

kemurnian DNA. Absorbansi isolat DNA murni pada panjang gelombang 260 nm / 280 nm adalah 1,8 sampai 2,0. Apabila rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm / 280 nm memiliki nilai lebih rendah dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi RNA dan jika absorbansinya lebih dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi dari protein (Sambrook dan Russell, 1989). Pengujian isolat DNA juga dapat dilakukan dengan cara elektroforesis gel agaros.

Prinsip dasar teknik elektroforesis gel agaros adalah satu cara untuk memisahkan fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik. Sampel dalam sumur gel agaros berisi larutan penyangga TAE (*buffer* Tris Asetat EDTA) yang berfungsi sebagai pengstabil pH dengan arus tertentu, mengingat DNA terdiri dari basa – basa nitrogen dalam penyusunan nukleotidanya. Molekul DNA bermuatan negatif ditempatkan dalam katoda, saat dialiri arus listrik molekul DNA bermigrasi ke anoda bermuatan positif. Selanjutnya visualisasi dilakukan dengan bantuan sinar UV sehingga pita DNA dapat terlihat. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Visualisasi hasil elektroforesis gel agaros (Lee Pie yun *et al.* 2012).

F. *Real Time PCR*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Prinsip dasar PCR adalah untuk memperbanyak

sekuen DNA atau replikasi DNA yang terjadi di luar tubuh makhluk hidup. Satu untai DNA direplikasi menjadi, dua, empat, delapan untai DNA, dan terus kelipatannya. Metode ini membutuhkan tahapan isolasi DNA, amplifikasi sekuen DNA target dengan PCR, pemisahan produk ampikon dengan elektroforesis untuk mengetahui ukuran fragmen DNANYa (Hardoyo. D dan Rudiretna, 2001).

Modifikasi metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode *real time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Metode ini memiliki prinsip yang sama dengan PCR konvensional, tetapi memiliki perbedaan pada kemampuan sensitivitas dan spesifisitasnya. *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) memiliki sensitivitas dan spesifisitas lebih tinggi dibandingkan dengan PCR konvensional. *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) dapat memperkecil kontaminasi selama proses pengujian karena metode ini tidak membutuhkan elektroforesis gel agarose untuk mengkonfirmasi hasil PCR sementara elektroforesis dibutuhkan PCR konvensional untuk melihat hasil PCR. Hasil pengujian *real time* PCR kualitatif dan kuantatifnya dapat secara langsung dilihat saat reaksi berlangsung atau setelah siklusnya berakhir dan dapat diamati dari hasil grafik amplifikasi yang terbentuk (Dorak, 2006). Baik metode PCR konvensional atau *real time* PCR membutuhkan beberapa bahan yang sama, satu bahan pembeda dari *real time* adalah adanya zat pewarna *probe* atau pewarna *non-probe* yang dibutuhkan untuk menghasilkan sinyal dalam mendeteksi amplifikasi DNA yang terbentuk. Bahan – bahan yang dibutuhkan yaitu sebagai berikut :

1. Templat DNA

Templat DNA adalah cetakan DNA untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama dengan DNA induknya. Penyiapan templat DNA dapat dilakukan dengan metode isolasi DNA. Metode isolasi untuk mendapatkan DNA templat mempengaruhi hasil konsentrasi DNA. Konsentrasi DNA yang tinggi dan kemurnian yang sesuai (1,8 – 2,0 pada pengukuran perbandingan panjang gelombang 260 nm / 280 nm) adalah salah satu kontrol dalam pemilihan templat DNA yang akan

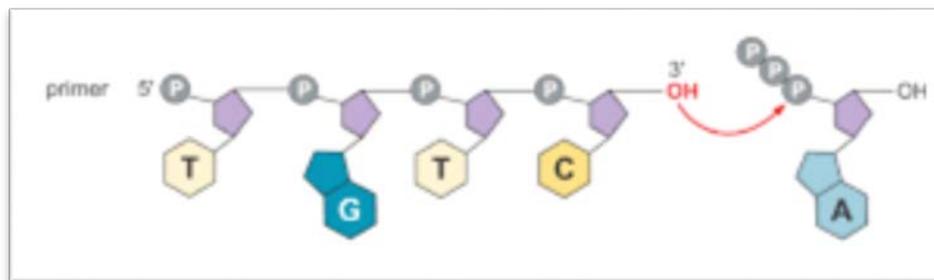
digunakan dalam proses PCR. Konsentrasi templat DNA yang dapat digunakan dalam PCR yaitu 50 sampai 100 nM.

Cetakan DNA berbentuk DNA untai tunggal dari DNA induk yang akan ditempelkan dengan primer, sementara primer akan diperpanjang oleh DNA polimerase untuk membentuk DNA heliks. Selama proses PCR berlangsung DNA templat dari DNA induk akan menjadi DNA anak dan DNA anak akan terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. DNA untai tunggal yang terbentuk dijadikan sebagai cetakan DNA atau templat DNA yang baru, begitu seterusnya.

2. Primer

Primer adalah nukleotida pendek yang terdiri dari basa nitrogen, gula pentosa dan gugus pospat yang berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA selama pembentukan DNA baru. Pembuatan primer dapat dilakukan dengan merancangya menggunakan aplikasi NetPrimer atau dengan NCBI. Hasil rancangan yang dibuat selanjutnya disintesis untuk menjadikannya molekul DNA yang dapat digunakan dalam penelitian. Nukleotida yang sama perlu dihindari dalam perancangan primer karena dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* atau penempelan primer yang tidak sesuai.

Kandungan guanin dan sitosin pada primer sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan guanin dan sitosin dari DNA target. Kandungan guanine dan sitosin pada primer yang rendah akan mempengaruhi penurunan efisiensi dalam proses PCR. Primer menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Gambar 8 adalah gambar struktur primer.



Gambar 8. Struktur primer (Molecular Biology, 2017).

3. dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*)

dNTPs merupakan suatu campuran terdiri dari dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). dNTPs dijadikan sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA cetakan.

4. *Buffer* PCR dan MgCl₂

Proses *Polymerase Chain Reaction* yang melibatkan DNA memerlukan *buffer* atau larutan penyangga yang akan menjaga dan menstabilkan pH selama siklus PCR, mengingat DNA adalah molekul kompleks yang terdiri dari basa – basa nitrogen. Apabila tidak digunakan *buffer* memungkinkan pH dalam reaksi tidak stabil karena basa – basa nitrogen tersebut yang dapat menaikkan pHnya. Hal ini penting untuk diperhatikan karena reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu.

Ion Mg²⁺ berasal dari MgCl₂ yaitu sebagai kofaktor yang berfungsi mengstimulasi aktivitas enzim *polymerase*. Adanya MgCl₂ akan meningkatkan interaksi primer dengan templat. Konsentrasi MgCl₂ yang sesuai akan berpengaruh pada tingginya spesifisitas hasil PCR. Umumnya konsentrasi optimal MgCl₂ berkisar 1,0 – 1,5 mM (Pestana *et al*, 2010).

5. DNA *Polimerase*

DNA *polimerase* merupakan Enzim yang berfungsi sebagai katalis untuk reaksi polimerisasi DNA. Enzim DNA *polimerase* didapat dari hasil isolasi bakteri termofilik atau hipertermofilik sehingga enzim ini bersifat termostabil dan stabil sampai suhu 95°C. DNA *polymerase* berfungsi dalam melakukan perpanjangan primer pada proses *extension* PCR yang dibantu oleh kofaktor ion Mg²⁺ (Hardoyo. D dan Rudiretna, 2001).

6. Sybr green I

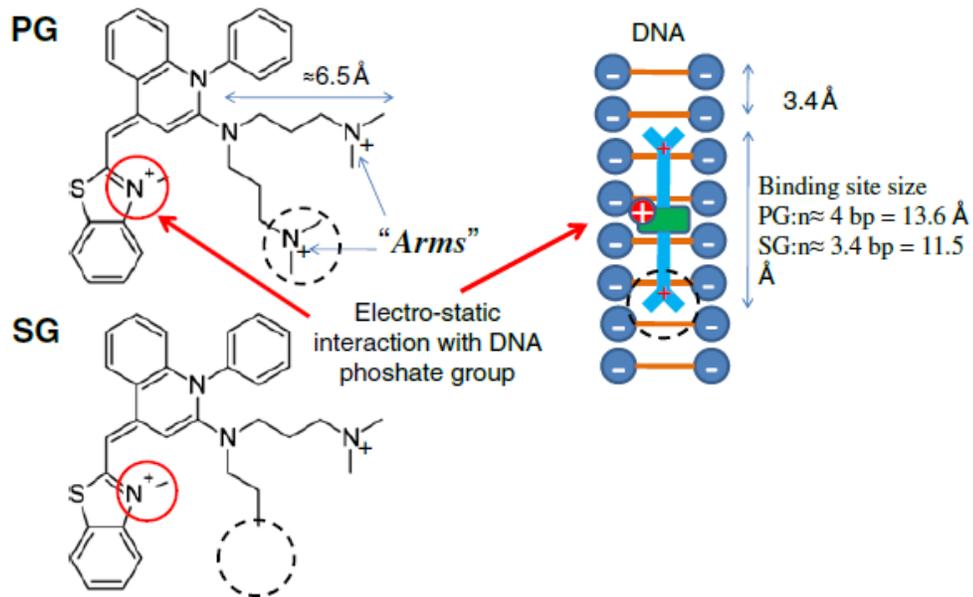
Sybr *green* I adalah salah satu *fluorescent dye* yang mengukur intensitas fluoresen secara proporsional sesuai dengan produk PCR yang dihasilkan. Ketika sybr *green* I berada dalam kondisi bebas dalam larutan, maka akan menunjukkan tingkat fluoresen yang relatif rendah atau pendaran yang rendah, tetapi ketika dsDNA ditambahkan, fluoresen yang berpendar akan meningkat lebih dari 1000 kali lipat saat DNA *double* strain terbentuk. Sybr *green* digunakan sebagai *dye fluorescence* karena lebih mudah untuk mendeteksi produk PCR (amplikon) dan ekonomis, dibandingkan penggunaan *probe* serta lebih sensitif dibanding ethidium bromida pada elektroforesis gel agarosa.

Sybr *green* bekerja dengan cara menyisip pada DNA untai ganda dan mengeksitasikan sinar. Sinar berupa fluoresen akan meningkat sebanding dengan bertambahnya produk PCR yang teramplifikasi dalam reaksi. Peningkatan produk PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Semakin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen akan terbaca (Dorak, 2006).

Dalam analisa pengujian *real time* PCR dengan menggunakan pewarna DNA sybr *green* dilakukan analisis kurva puncak pelelehan (*melt peak curve*) dengan melihat titik puncak pelelehan (*melt peak*) dan nilai T_m (*melting temperature*). Hal ini disarankan dalam *quantitect sybr green* PCR handbook (2011), seperti yang sudah diketahui prinsip dari sybr *green* adalah mengikat setiap DNA untai ganda yang terbentuk sehingga menghasilkan *peak* yang dibaca, sehingga memungkinkan ketiksesuaian DNA untai ganda yang terbentuk tetap terikat oleh sybr *green*. Nilai T_m sangat spesifik dan sebagai penanda pengujian, yang mana T_m tergantung pada panjang skuen DNA dan GC konten yang sesuai dengan DNA target sehingga sangat penting dalam melakukan pengukuran menggunakan T_m.

Sybr *green* I bersifat sebagai *intercalating* yang akan menyisip dalam stuktur kompleks DNA, di antara basa – basa nitrogen yang saling berikatan hidrogen. Struktur sybr *green* yang mengandung unsur nitrogen bermuatan positif akan

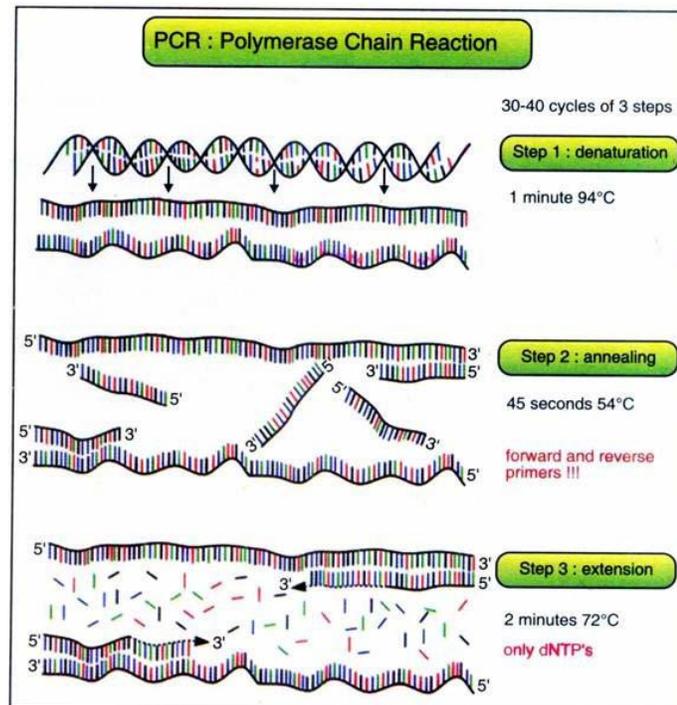
melakukan gaya elektrostatis dengan fosfat bermuatan negatif pada DNA (Dragan *et al.*, 2012). Gambar 9 menunjukkan interaksi sybr *green* dengan DNA untai ganda.



Gambar 9. Interaksi Sybr *green* dengan DNA (Dragan *et al.*, 2012)

Akumulasi dari amplicon juga akan meningkat seiring dengan meningkatnya siklus reaksi, maka intensitas fluoresen meningkat karena molekul sybr *green* I menyisip pada DNA dapat dilihat pada gambar 9. Hasil akumulasi dari amplicon dapat diukur dalam *real-time* PCR (Dorak, 2006). Campuran dari bahan – bahan PCR dihomogenkan dan diproses melalui tiga tahapan PCR.

Siklus dalam reaksi *polymerase chain reaction* berlangsung 35 - 40 siklus berulang. Proses PCR terdiri dari beberapa tahapan yaitu denaturasi DNA templat, *annealing* atau penempelan primer, *extention* atau perpanjangan untai DNA (Dorak, 2006). Tahapan PCR dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Tahapan *polymerase chain reaction* (Anonim, 2017).

Tahap *denaturation*, yaitu tahap awal dalam proses PCR. DNA heliks merupakan molekul yang kaku dan diperpanjang, sehingga larutan DNA memiliki viskositas yang tinggi. Jika larutan DNA dipanaskan sampai 95°C, maka viskositasnya akan menurun yang menandai terjadinya kehancuran struktur heliks ganda dan diiringi dengan pemisahan untai ganda menjadi untai tunggal yang sedikit fleksibel, sehingga tahap denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 20 – 30 detik. Proses ini terjadi pemutusan ikatan hidrogen yang terdapat pada untai ganda DNA. Untai tunggal menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat. Waktu yang digunakan dalam tahap ini yaitu 1 – 2 menit.

Tahap *annealing* (penempelan primer) yang biasanya dilakukan pada suhu 50 – 72 °C selama 20 - 40 detik. Suhu penempelan primer pada untai tunggal DNA menjadi kunci dalam menentukan kekhasan reaksi PCR. Suhu penempelan primer dapat dihitung berdasarkan urutan nukleotida primer yang digunakan. Suhu penempelan optimal berkisar 50°C dari suhu perhitungan penempelan primer. Jika

suhu penempelan terlalu rendah dapat menyebabkan *mispriming*, yaitu penempelan primer tidak sesuai dengan DNA cetakan sehingga didapat produk tidak spesifik.

Tahap *extention*, yaitu tahap perpanjangan primer yang bergantung pada enzim DNA *taq polymerase*. Enzim *taq polymerase* memiliki aktivitas optimum pada suhu 75 – 80 °C, yang umumnya digunakan pada suhu 72 °C. Pada tahap ini DNA polimerase akan memasangkan dNTP yang sesuai pada pasangannya, jika basa pada templat adalah Adenin (A) maka akan dipasangkan dNTP begitu seterusnya (Innis et al., 1990).

G. Pembacaan Produk Real Time PCR

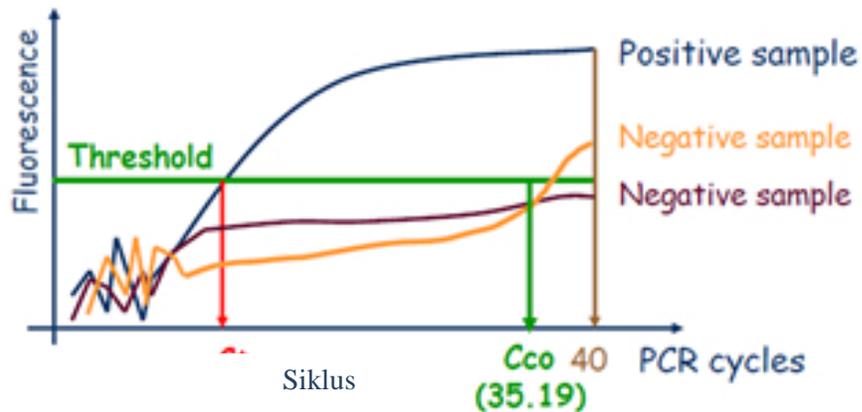
Amplifikasi yang dijalankan dalam *thermal cycle* ditampilkan dalam bentuk grafik pada layar komputer dengan *software* sesuai dengan *thermal cycle*. Grafik yang diperoleh berupa grafik amplifikasi, kurva standar, dan kurva peleburan (*melt curve*). Grafik – grafik tersebut digunakan sebagai data untuk mengevaluasi kinerja amplifikasi *real time* PCR.

a. Grafik amplifikasi

Grafik amplifikasi terbentuk saat proses amplifikasi dimulai. Dalam grafik ini menunjukkan apakah dalam *thermal cycle* terjadi amplifikasi atau tidak. Grafik amplifikasi dapat dilihat pada gambar 11, yaitu hubungan antara siklus pada sumbu x dan fluoresen pada sumbu y. Amplifikasi ditetapkan berdasarkan intensitas fluoresen, semakin banyak produk amplifikasi yang dihasilkan maka semakin besar akumulasi fluoresen yang terbaca (Dorak, 2006).

Peningkatan fluoresen tersebut ditandai dengan terbentuknya grafik sigmoid yaitu grafik yang ditandai dengan warna biru pada gambar 11. Garis berwarna hijau menunjukkan nilai *threshold* atau nilai ambang batas suatu sinyal pewarna. Grafik sigmoid yang berpotongan dengan *base line* atau *threshold* yang telah ditentukan secara otomatis oleh program maka sampel yang digunakan adalah sampel positif atau sampel DNA berhasil teramplifikasi. Titik perpotongan antara grafik sigmoid dan *base line threshold* jika direfleksikan terhadap sumbu x (siklus) disebut *threshold*

cycle (Ct) bagi sampel yang diamplifikasi (Pestana *et al.* 2010). Gambar 11 menunjukkan grafik amplifikasi dalam proses *real time polymerase chain reaction*.



Gambar 11. Amplifikasi DNA (archives.eppo.int, 2017).

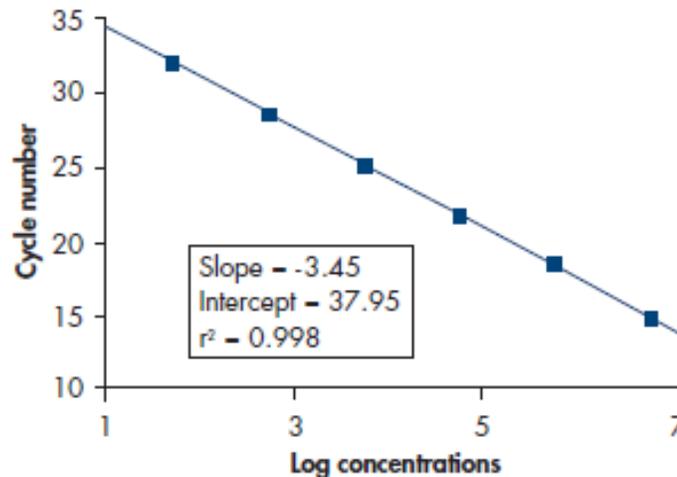
Nilai *threshold cycle* (Ct) adalah siklus di atas *noise* (sinyal yang tidak teratur intensitasnya dan berada di bawah *threshold*). Akumulasi produk yang terbaca pertama kali pada fase eksponensial (fase saat nilai Ct diketahui). Nilai *threshold cycle* (Ct) digunakan dalam kurva standar sebagai fungsi terhadap log konsentrasi DNA.

b. Kurva standar

Kurva standar merupakan hubungan antara log konsentrasi templat DNA dan *threshold cycle* (Ct) yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah templat DNA yang masih dapat dideteksi oleh primer dan reagen PCR. Nilai *threshold cycle* (Ct) dalam persamaan garis yang terbentuk adalah nilai y dan log konsentrasi merupakan nilai x yang menjadi variabel terikat dalam hal ini, sementara konsentrasi isolat DNA sebagai variabel bebas.

Isolat DNA bakteri yang telah diketahui konsentrasinya (ng/ μ L) diencerkan hingga konsentrasi DNA bakteri sebagai templat DNA terendah. Seluruh tingkat pengenceran yang berturut – turut, misalkan mengandung $10^0 - 10^{-6}$ (ng/ μ L) yang

diampifikasi. Amplifikasi beberapa tingkat pengenceran secara otomatis oleh *software* akan digambarkan dalam kurva standar.



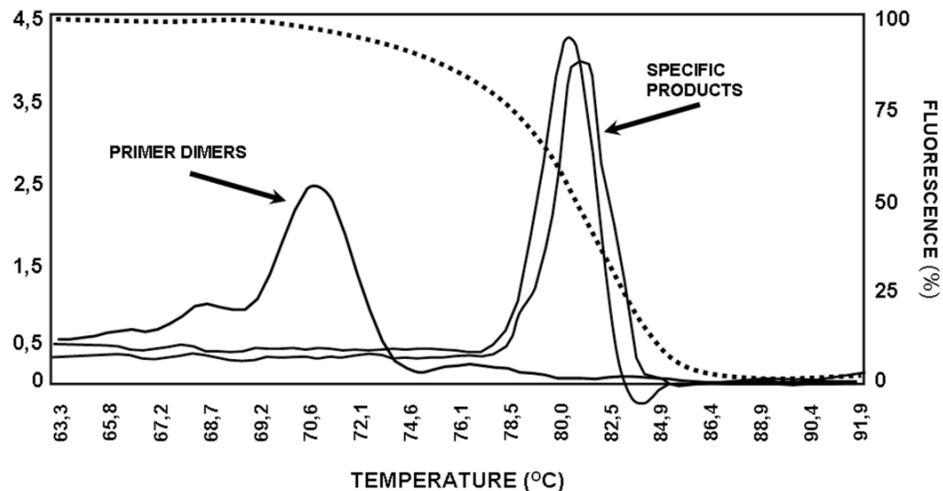
Gambar 12. Kurva standar amplifikasi PCR (Qiagen, 2010).

Kurva standar yang ideal dapat mencapai nilai optimal, apabila didapat nilai efisiensi 96 – 110 %; dan *slope* -3,2 hingga 3,6. Efisiensi merupakan faktor penting untuk setiap metode kuantitatif PCR yang *realible*. Tingginya nilai presentase efisiensi yang diperoleh (>110%) menjadi indikator terjadinya *pippeting error* atau tidak konstan saat melakukan pipetasi sehingga mempengaruhi volume yang dipipet dan terlalu keras serta seringnya melakukan pipetasi naik turun dapat menyebabkan kerusakan campuran di dalam tabung *ependrof* ketika dilakukan pengenceran, terjadinya amplifikasi pada produk yang tidak spesifik, dan keberadaan dari primer - dimer (Pestana *et al.* 2010). Primer - dimer merupakan proses saling berikatannya primer yang teramplifikasi dan terkuantifikasi sehingga dihasilkan pengujian yang *false-positive*.

c. Kurva peleburan atau *Melt curve*

Kurva peleburan atau *Melt curve* merupakan kurva hubungan antara suhu dan turunan dari unit fluoresen yang digunakan untuk mengamati perubahan dalam suhu

peleburan. Suhu peleburan adalah suhu dimana 50% amplicon DNA untai ganda terpisah menjadi dua untai tunggal. *melt curve* diperoleh berdasarkan siklus yang ditambahkan setelah siklus amplifikasi (Dorak, 2006). Gambar 13 adalah kurva peleburan dalam proses PCR.



Gambar 13. Analisis *melting curve real time* PCR (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011)

Puncak kurva pada *melt curve* menunjukkan nilai suhu *melting* (T_m) amplicon. Amplicon yang berasal dari DNA target yang sama akan memiliki nilai T_m yang sama, ditunjukkan dengan puncak pada titik suhu yang sama dan produk amplicon yang dihasilkan telah spesifik. DNA dari sumber yang berbeda memiliki nilai T_m yang berbeda pula. Hal ini dikarenakan DNA – DNA tersebut memiliki jumlah pasangan basa G : C dan A : T yang berbeda. Pasangan G : C memberikan stabilitas yang lebih besar pada heliks, sehingga semakin tinggi kandungan GC maka semakin tinggi pula nilai T_m -nya. Nilai T_m dalam kondisi standar bisa dipakai untuk mendapatkan perkiraan kandungan G + C dalam DNA tidak dikenal (Ngili Yohanis, 2010).

Berdasarkan Mangold *et al* pada tahun (2005) menyatakan sampel yang memiliki nilai T_m tidak jauh berbeda dengan kontrol positif atau perbedaannya $1^\circ - 2^\circ$ dari nilai T_m kontrol positif, maka dapat dinyatakan sampel tersebut positif. *Melt*

curve juga menunjukkan keberadaan molekul tidak spesifik dimana produk akan membentuk puncak pada suhu yang berbeda dengan ampikon atau dapat memiliki lebih dari satu puncak suhu yang menunjukkan adanya primer dimer.

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Jakarta dan Lembaga Mitra Laboratorium Forensik MABES POLRI Kalimantan. Waktu penelitian berlangsung dari bulan November 2016 - Desember 2017.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen dan eksponensial.

1. Alat dan Bahan

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Elektroforesis (BioRad), UV transluminator (BDA Digital), *Real Time Polymerase Chain Reaction (Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System)*, *autoklaf (All American)*, Nano Drop (NanoVue Plus), *Shaking Water Bath (Stuart SDS40)*, *Inkubator (Memmert)*, *Laminar Airflow (Esco)*, *Vortex Mixer (Maxi Mix II)*, *hotplat (Stuart)*, tabung *mikrosentrifuge 1,5 mL*, dan *100 µL (Extragene)*, *mikrosentrifuge (Sorval Legend Micro 17R)*, pipet mikro 0,2 – 20; 0,5 – 10µL; 10 - 100µL, dan 100 - 1000µL (BioHit) dan (BioRad) dengan tip steril, kertas parafilm, jarum ose steril, pemanas bunsen, gelas kaca (*Pyrex*), *freezer (Sharp)*, kulkas, dan alat dokumentasi.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang dibeli dari Laboratorium Mikrobiologi UI dalam medium padat miring. Bahan yang digunakan di antaranya adalah *Luria Broth*, *Salmonella Shigella Agar*, *GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Digestion Solution, Proteinase K, RNase Solution, LysisSolution, Etanol 50%, Wash Buffer I dan II, Elution Buffer)* (Thermo Scientific), etanol 70%, pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* hasil sintesis, *PCR Master Mix*

Sybr Green I dan *Nuclei Free Water* (SMOBIO), Agarosa (Promega), *Loading Dye* 6x (Promega), *Buffer TAE* 1x (*Tris-acetat-EDTA*) (Thermo Scientific), etidium bromida 0,1 % (Promega), *DNA Ladder* 1 Kb (Thermo Scientific), *DNA Ladder* 100 bp (Thermo Scientific), desinfektan, dan tisu.

2. Prosedur Kerja

2.1 Uji Konfirmasi Sampel dari bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi*

Biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari media padat miring yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UI dan telah dibuat *gliserol stock* sebagai sampel. Biakan dari *gliserol stock* diambil menggunakan jarum ose steril dan ditanam dalam media padat selektif *Salmonella Shigella Agar (SSA)* dengan metode *streak plate*. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 16 - 18 jam pada suhu 37°C. Hasil biakan diidentifikasi setelah 18 jam. Indikasi tumbuhnya bakteri *Salmonella typhi* dibuktikan dengan adanya koloni dengan bagian tengahnya berwarna hitam, sementara koloni tidak berwarna adalah mengindikasikan tumbuhnya bakteri *Shigella dysenteriae* (HiMedia, 2015). Koloni bakteri yang terbentuk diambil dan ditanam kembali pada media *luria broth*. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 16 - 18 jam pada suhu 37°C. Perubahan keruhnya media *luria broth* menandakan bahwa inokulum bakteri berhasil tumbuh dengan baik dalam media tersebut.

2.2 Isolasi dan Pengujian isolat DNA bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi* yang dihasilkan

Isolat genom bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi* didapatkan dengan cara mengisolasi atau mengekstrak genom bakteri tersebut. Dalam penelitian ini isolasi genom bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi* menggunakan kit komersial yaitu “*GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722 (Thermo Scientific)*” dengan menggunakan protokol isolasi DNA bakteri negatif dari kit tersebut.

Sejumlah 1 mL inokulum bakteri yang ditumbuhkan selama 18 jam dimasukkan dalam tabung mikrotube 1,5 mL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 x g selama 10 menit dan menghasilkan residu (*pellet sel*) dan supernatan. Supernatan dipisahkan ke dalam *beaker glass* berisi desinfektan. Residu yang masih terdapat dalam tabung *ependorf* ditambahkan 180 μ L *digestion solution* sebagai larutan untuk menghancurkan dinding *nucleus* dilakukan dengan cara resuspensi atau pipetan naik turun sampai homogen.

Pengendapan protein dalam DNA dilakukan dengan menambahkan *proteinase K solution* sebanyak 20 μ L pada *lysat* bakteri dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 56°C untuk mengoptimalkan pelisisan sel bakteri dan pembersihan protein, kemudian didiamkan pada suhu kamar. Dilanjutkan dengan penguraian *RNAse* dengan menambahkan 20 μ L *RNAse solution*, divortex dan diinkubasi 10 menit pada suhu kamar, selanjutnya penambahan 200 μ L *lysis solution* dan di *vortex* (dihomogenkan) 15 detik. Jika telah homogen ditambahkan 400 μ L etanol 50% yang berfungsi melarutkan senyawa – senyawa selain DNA kemudian di *vortex*. Hasil *lysate* sel dipindahkan kedalam *Purification colum* dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 x g selama 1 menit hingga menghasilkan *pellet* dan supernatan.

Pellet yang dihasilkan dibersihkan dengan menambahkan 500 μ L *wash buffer I* dan disentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. Selanjutnya *pellet* ditambahkan 500 μ L *wash buffer II* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 x g selama 3 menit untuk membersihkan DNA dari pengotor. *Pellet* yang ada dalam *column* dipindahkan ke tabung *collection column* yang baru dan ditambahkan 200 μ L *elution buffer* untuk mengikat pengotor dari DNA sehingga didapat DNA murni, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 x g. Hasil isolasi yang didapat disimpan dalam tabung *ependorf* 1,5 mL dan pada suhu 2 - 8°C.

Isolat bakteri yang dihasilkan dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agaros 1,5 % dan menggunakan *etidium bromide* sebagai pewarna. Mereaksikan 2 μ L *loading dye* 6x dengan 3 μ L *DNA leader* 1 Kb sebagai *marker* dan diambil 10 μ L isolat genom

dihomogenkan dengan 2 μL *loading dye* 6x sebagai pemberat sehingga sampel tidak keluar dari *well*. Selanjutnya campuran tersebut dimasukkan dalam *well* gel agaros yang direndam dengan *buffer* TAE 1X dalam *chamber mini-sub DNA Electrophoresis Cell*. *Buffer* TAE 1X berfungsi untuk mempertahankan pH selama elektroforesis berlangsung selama 60 menit dengan tinggi volt 70. Pemeriksaan hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan sinar UV.

Sementara pengujian isolat secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan alat *Nano Drops*. Sampel diambil sebanyak 1 μL kemudian diletakkan di lensa nano, ditutup dan dianalisa. Hasil kemurnian dan konsentrasi akan langsung terbaca absorbansi pada panjang gelombang 260 nm / 280 nm dan tersimpan.

2.3 Konfirmasi primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dengan metode *Real Time PCR*.

Konfirmasi primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dilakukan untuk mengetahui kinerja primer dalam mendeteksi keberadaan DNA bakteri dengan teramplifikasinya DNA menggunakan metode *real time PCR*. Uji konfirmasi dilakukan dengan mereaksikan 10 μL *master mix sybr green*, 1 μL *primer forward*, 1 μL *primer reverse*, 6 μL ddH₂O dan 2 μL DNA templat. Sehingga volume reaksi 1 x PCR adalah 20 μL . Dilakukan pencampuran PCR *mix* sebanyak tiga reaksi, dua reaksi sebagai sampel (pengulangan dua kali) dan satu reaksi sebagai NTC. PCR *mix* sesuai volumenya dicampurkan kecuali templat, kemudian didistribusikan ke dalam setiap *well* pada *plate 96 well reaction*. Kemudian pada *well* 1 dan 2 campuran PCR *mix* direaksikan dengan 2 μL DNA templat dan *well* ke-3 sebagai NTC campuran PCR *mix* ditambahkan dengan 2 μL ddH₂O. Selanjutnya *plate 96 well reaction* ditutup dengan PCR *sealer*TM *Microseal* dan dimasukkan ke dalam alat *real time PCR* dengan menggunakan protokol PCR yaitu, PCR *initial denaturation* suhu 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 30 detik.

2.4 Pengujian spesifisitas pasangan primer gen *fim-C* dengan metode *Real Time PCR*.

Pengujian spesifisitas dilakukan untuk mengetahui kesesuaian dari primer tersebut, apakah benar primer gen *fim-C Salmonella typhi* hanya dapat mengenali DNA *Salmonella typhi*.

Pengujian ini dilakukan dengan mereaksikan 2 μL DNA templat, 10 μL *master mix sybr green*, 1 μL *primer forward*, 1 μL *primer reverse*, dan 6 μL ddH₂O, sehingga volume reaksi PCR adalah 20 μL dan dilakukan pada *initial denaturation* suhu 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 30 detik. Sepasang primer gen *fim-C* genom *Salmonella typhi* diujikan pada templat DNA *Shigella dysenteriae* dan genom *Salmonella typhi* sebagai kontrol positif.

2.5 Pengujian sensitivitas primer gen *fim-C* bakteri dengan metode *Real Time PCR*

Penujian sensitivitas primer merupakan limit deteksi terendah yang mampu dicapai oleh primer atau pendeteksi *real-time PCR* pada konsentrasi terendah dari template DNA. Hasil sensitivitas direalisasikan dengan kurva standar yang linear.

Pengujian dilakukan dengan mereaksikan 2 μL DNA templat, 10 μL *master mix sybr green*, 1 μL *primer forward*, 1 μL *primer reverse*, dan 6 μL ddH₂O, sehingga volume reaksi PCR adalah 20 μL dan dilakukan pada *initial denaturation* suhu 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 30 detik. DNA templat dari masing – masing sampel yang digunakan dari varian 4 pengenceran.

C. Teknik Pengumpulan dan Analisa Data

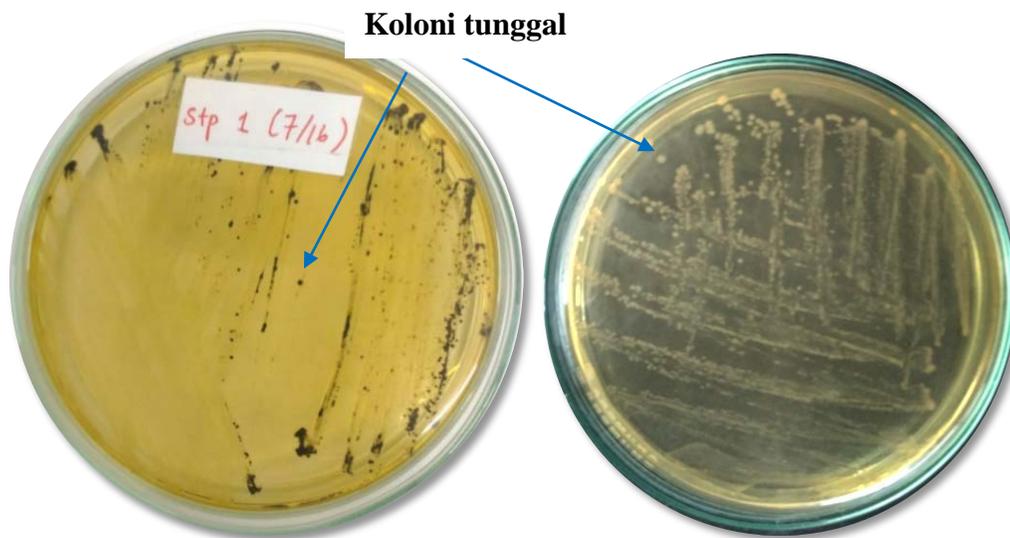
Pengambilan data pertama ialah uji konfirmasi sampel bakteri dan konfirmasi kemurnian isolat DNA yang digunakan sebagai sampel. Dilanjutkan dengan uji konfirmasi primer gen *fim -C*, setelah konfirmasi sesuai dilanjutkan dengan uji

spesifisitas dan sensitivitas primer gen *fim* -C dari *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Konfirmasi Sampel dari bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi*

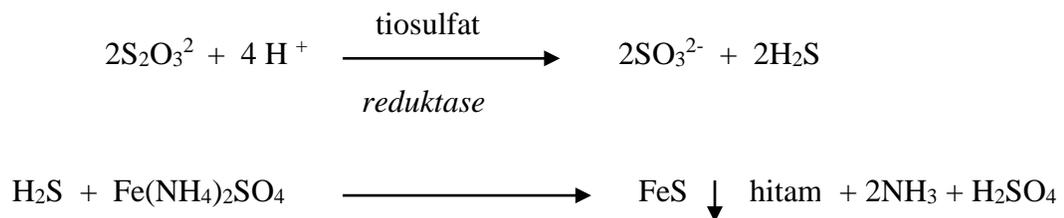
Perlu dilakukan pengujian sampel bakteri terlebih dahulu untuk meyakinkan bahwa sampel yang digunakan benar bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Pengujian dilakukan dengan uji konfirmasi koloni bakteri dalam media selektif *Salmonella Shigella* agar. Berikut adalah gambar 14 hasil konfirmasi koloni sampel bakteri dengan teknik *streak plat*.



Gambar 14. Hasil strik bakteri (a) *Salmonella typhi* dan bakteri (b) *Shigella dysenteriae* pada media SSA.

Gambar 14 a menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh adalah *Salmonella typhi*, dimana terlihat inokulum bakteri bagian tengah yang berwarna hitam pada media SSA. Sementara pada gambar 14 b menunjukkan inokulum tidak berwarna yang menunjukkan tumbuhnya bakteri *Shigella dysenteriae* pada media SSA. Hasil ini sesuai dalam konfirmasi bakteri pada media selektif SSA yaitu, apabila inokulum

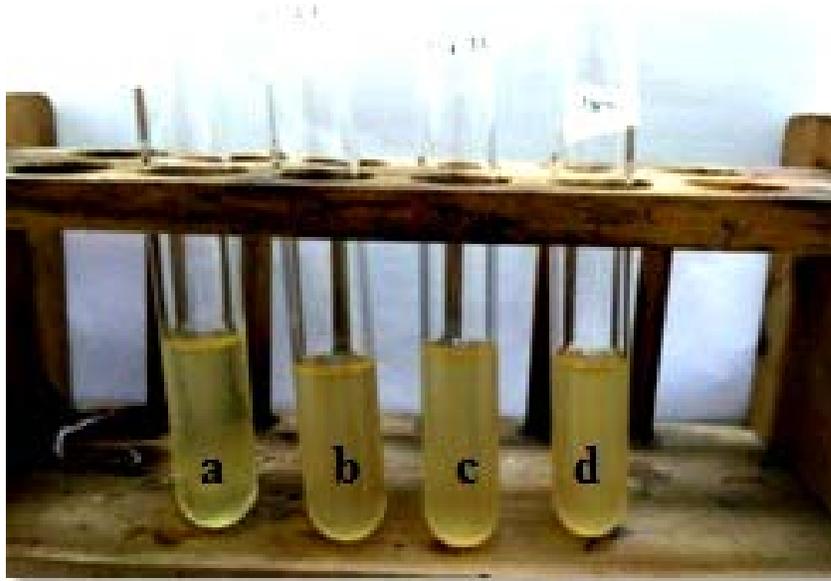
bakteri yang tumbuh adalah *Salmonella typhi* ditandai dengan munculnya koloni bakteri tidak berwarna dan bagian tengah berwarna hitam. *Salmonella typhi* tidak mengfermentasi laktosa dalam media dan memproduksi gas H₂S yang terbentuk akibat reaksi natrium tiosulfat sebagai sumber sulfur dengan ion hidrogen dari air dan dengan adanya enzim *tiosulfat reduktase*, maka akan dihasilkan ion sulfidat dan gas H₂S. Gas ini akan bereaksi dengan feri ammonium sulfat yang ditambahkan (sebagai indikator untuk H₂S) kedalam media sehingga terbentuk garam FeS yang menyebabkan adanya warna hitam dalam koloni dan ammonia yang dihasilkan akan mengstabilkan pH, sementara bakteri *Shigella dysenteriae* tidak menghasilkan gas H₂S dan tidak mengfermentasi laktosa dengan inokulum yang terbentuk tidak berwarna (HiMedia, 2008). Gambar 15 menunjukkan reaksi yang terjadi pada uji SSA sebagai berikut :



Gambar 15. Reaksi pembentukan FeS pada uji SSA (HiMedia, 2008).

Analisa di atas menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah benar bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Inokulum tunggal yang dihasilkan pada tahap pengujian dengan teknik *streak plat* dibiakan kembali dalam media *luria broth*.

Pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada media *luria broth* dilakukan untuk menyediakan kecukupan jumlah bakteri yang akan diisolasi. Gambar 16 adalah hasil biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam media *luria broth*.



Gambar 16. Inokulum bakteri *Salmonella typhi* (a, b) dan *Shigella dysenteriae* (c, d).

Berdasarkan gambar 16 bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang dibiakan dalam media *luria broth* selama 16 - 18 jam pada suhu 37°C berhasil dilakukan karena terjadi perubahan kekeruhan pada media. Hal ini yang menunjukkan pertumbuhan bakteri dalam media. Menurut Himedia tahun (2015) bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang dibiakan dalam media *luria broth* akan tumbuh dengan optimal pada suhu 37 °C selama 16 - 18 jam.

B. Isolasi dan Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Genom Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* Pada Biakan Murni

Tahapan isolasi dilakukan untuk mendapatkan isolat DNA bakteri sampel yang digunakan sebagai templat DNA dalam reaksi *polymerase chain reaction*. Hasil isolasi DNA didapatkan isolat sejumlah 200 µL dari masing – masing sampel bakteri yang disimpan dalam tabung *ependorf* 1,5 mL pada suhu -20 °C.

Dilakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif dari isolat DNA. Hasil uji kuantitatif kemurnian dan konsentrasi genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* disajikan dalam bentuk tabel 1 sebagai berikut :

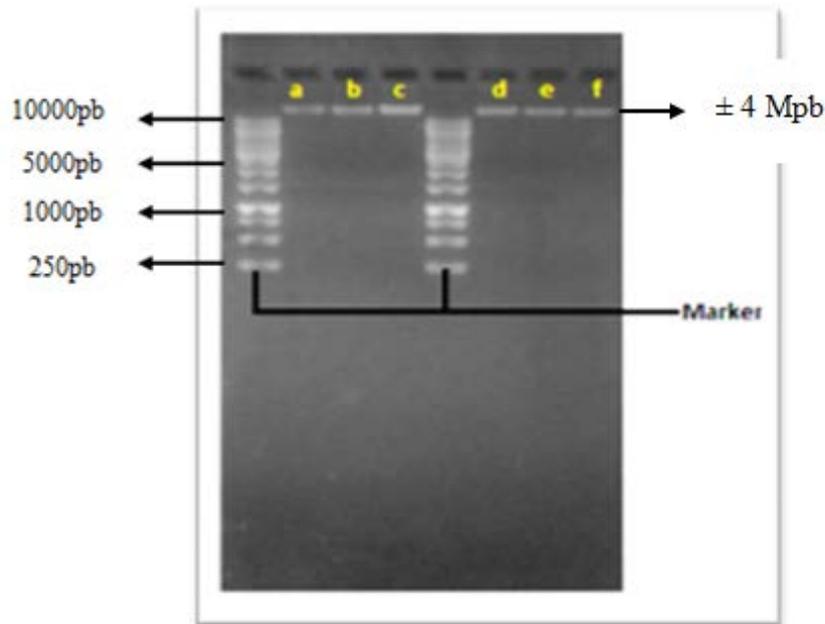
Tabel 1. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

Isolate genom Bakteri	Volume DNA	Nilai Absorbansi pada λ 260 nm / 280nm	Konsentrasi ng/ μ L
<i>Salmonella typhi</i>	200 μ L	1,850	27,83
<i>Shigella dysenteriae</i>	200 μ L	1,993	22,00

Berdasarkan table 1 diperoleh informasi bahwa isolat DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* memiliki kemurnian DNA yang baik karena memiliki rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm / 280 nm masih di antara 1,8 – 2,0 yaitu masing – masing 1,850 dan 1,993. Berdasarkan Sambrook dan Russell (1989), kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorbansi A 260 nm / 280 nm dengan nilai kemurnian berkisar antara 1,8 – 2,0. Pada perbandingan A 260 nm / 280 nm memiliki nilai lebih rendah dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi dari protein atau fenol. Sementara hasil uji secara kualitatif yaitu dengan elektroforesis gel agaros adalah sebagai berikut.

Hasil visualisasi elektroforesis gel agaros 1,5 % pada gambar 17 memberikan informasi bahwa DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* berhasil diisolasi dengan menggunakan kit komersial *GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721. #K0722 (Thermo Scientific)*. Munculnya pita – pita DNA pada gel agaros dengan posisi pita DNA berada di posisi paling tinggi dari marker DNA yaitu > 1 Kbp. Hal ini menunjukkan bahwa hasil ini sesuai dengan informasi database ukuran genom untuk bakteri *Salmonella typhi* yaitu pada well a, b, dan c sebesar \pm 4.8 Mpb dan *Shigella dysenteriae* pada well d, e, dan f sebesar \pm 4.37 Mpb (Deng *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). Terbentuknya pita tunggal DNA pada kedua sampel dengan tanpa adanya *smear* mengindikasikan kemurnian DNA dimana DNA

tidak terdegradasi dan terkontaminasi. Gambar 17 adalah hasil visualisasi elektroforesis gel agaros.



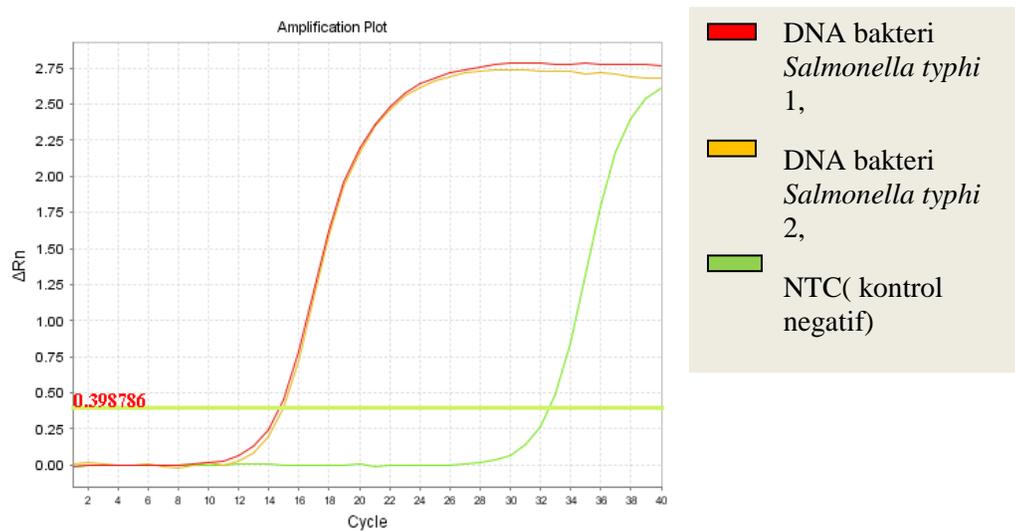
Gambar 17. Hasil uji kualitatif isolat DNA dengan elektroforesis gel agaros 1.5% *Salmonella typhi* (a, b, c) dan *Shigella dysenteriae* (d, e, f).

C. Konfirmasi primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dengan *Real Time PCR*

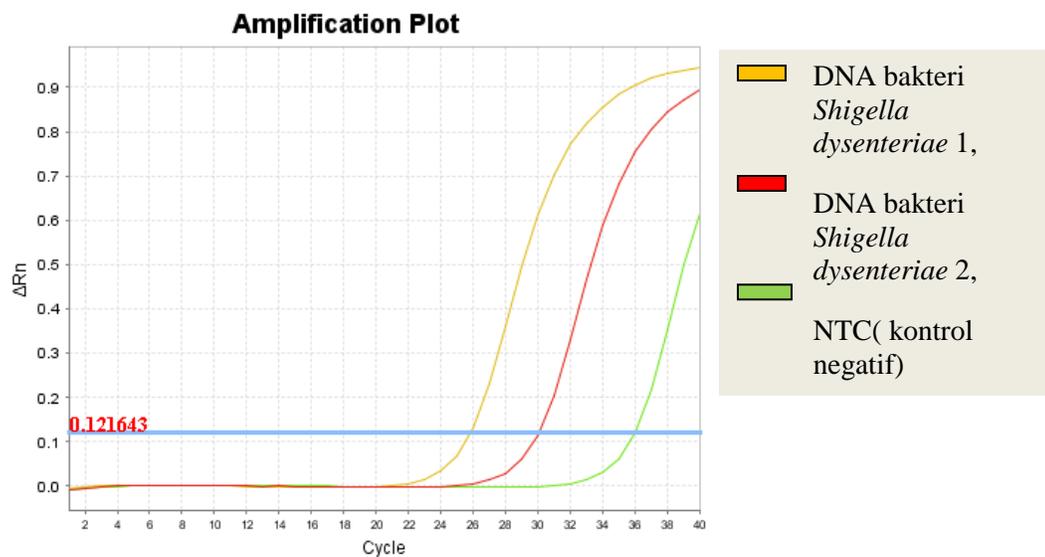
Konfirmasi primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dilakukan untuk mengetahui reaksi primer dan reagen serta program yang digunakan dalam mengenali target DNA bakteri. Hasil konfirmasi dapat diketahui dengan teramplifikasi DNA target pada metode real time PCR.

Gambar 18 dan 19 memberikan informasi bahwa kedua sampel DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil teramplifikasi dengan melihat nilai *threshold cycle* (Ct). *Threshold cycle* (Ct) ialah titik perpotongan antara grafik sigmoid dan baseline *threshold* yang direflesikan pada sumbu x. Kedua sampel DNA bakteri masing – masing dapat diketahui teramplifikasi pada siklus PCR ke 14, 783 dan 14, 923 untuk sampel *Salmonella typhi* dan 25, 844 dan 30,030 *Shigella dysenteriae*. Hal ini menunjukkan primer gen *fim-C* *Salmonella typhi* akan mengenali

DNA *Salmonella typhi* dengan menghasilkan nilai Ct yang disebutkan di atas jika dilakukan pengujian dengan *real time*. Begitu pula pada primer gen *fim-C Shigella dysenteriae* akan mendeteksi DNA *Shigella dysenteriae* pada Ct tersebut. Gambar 18 dan 19 adalah hasil konfirmasi primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* serta dalam tabel 2.



Gambar 18. Amplifikasi target DNA primer gen *fim-C Salmonella typhi*.



Gambar 19. Amplifikasi target DNA primer gen *fim-C Shigella dysenteria*

Hal ini menunjukkan bahwa primer gen *fim-C Salmonella typhi* dapat mengenali dan menempel pada DNA target dengan cepat yang ditunjukkan dengan nilai Ct yang rendah. Nilai Ct yang rendah juga menunjukkan kerja *fluoresence dey* yang segera mengikat DNA *doubel sraint* yang terbentuk. Nilai Ct ditentukan terutama oleh jumlah templat awal yang tepat, jika jumlah cetakan di awal reaksi tersedia banyak maka relatif sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk yang segera terikat oleh sinyal fluoresen, sehingga reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang rendah. Sebaliknya jika templat awal yang tersedia sedikit, maka reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang tinggi (BioRad, 2006). Hal ini terjadi pada sampel *Shigella dysenteriae* di mana nilai Ct yang dihasilkan cukup tinggi.

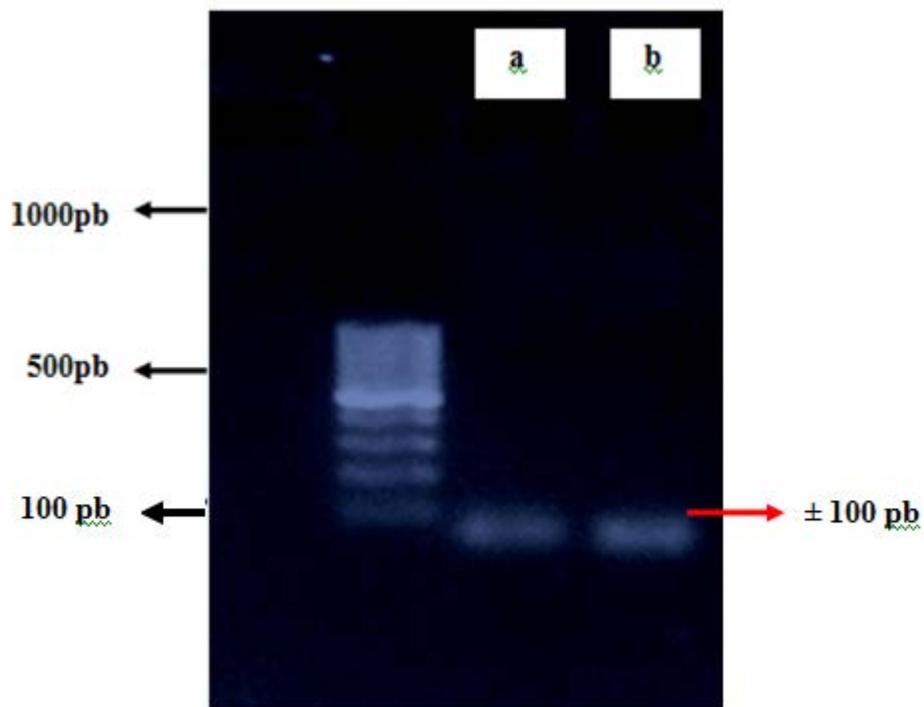
Konsentrasi DNA target yang digunakan 55,66 ng/ μ L pada templat *Salmonella typhi* dan 44,00 ng/ μ L pada templat *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan CBS *fungak biodiversity center* tahun (2015), konsentrasi DNA 10 ng/ μ L hingga lebih dari 100 ng/ μ L cukup digunakan dalam proses pengujian PCR dan konsentrasi di bawah 10 ng/ μ L seringkali berhasil dalam proses PCR.

Tabel 2. Hasil Amplifikasi Uji Konfirmasi Primer

Sampel	Fluoresen dey	Base line	Treshould cycle (Ct)
<i>Salmonella typhi</i> 1			14, 783
<i>Salmonella typhi</i> 2	<i>SYBR Green I</i>		14, 923
NTC <i>Salmonella typhi</i>		0,121643	32, 631
<i>Shigella dysenteriae</i> 1			25, 844
<i>Shigella dysenteriae</i> 2			30,030
NTC <i>Shigella dysenteriae</i>			35, 929

Grafik amplifikasi NTC atau kontrol negatif yang juga mengalami amplifikasi dengan nilai Ct sebesar 32, 631 pada templat *Salmonella typhi* dan 35, 929 pada

templat *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan Ferlianti. R *et al.*, tahun (2012) amplifikasi yang memiliki nilai Ct lebih dari 30 dinyatakan dengan N/A (*Not Applicable*). *Not Applicable* berarti sampel yang diuji dinyatakan negatif terhadap target. Sementara dalam buku Dorak tahun (2006), proses PCR setelah siklus 30 - 35, intensitas sinyal fluorescent akan mulai konstan yang menunjukkan bahwa pereaksi pada campuran PCR telah habis. Hal ini menunjukkan amplifikasi yang terjadi pada kontrol negatif masing – masing sampel dinyatakan negatif. Sedangkan hasil Ct dari sampel *Shigella dysenteriae* menunjukkan keraguan terhadap target sehingga dilakukan uji visualisasi dengan cara elektroforesis gel agaros 2%. Berikut merupakan hasil elektroforesis gel dari hasil uji konfirmasi primer gen *fim-C Shigella dysenteriae* pada gambar 20.



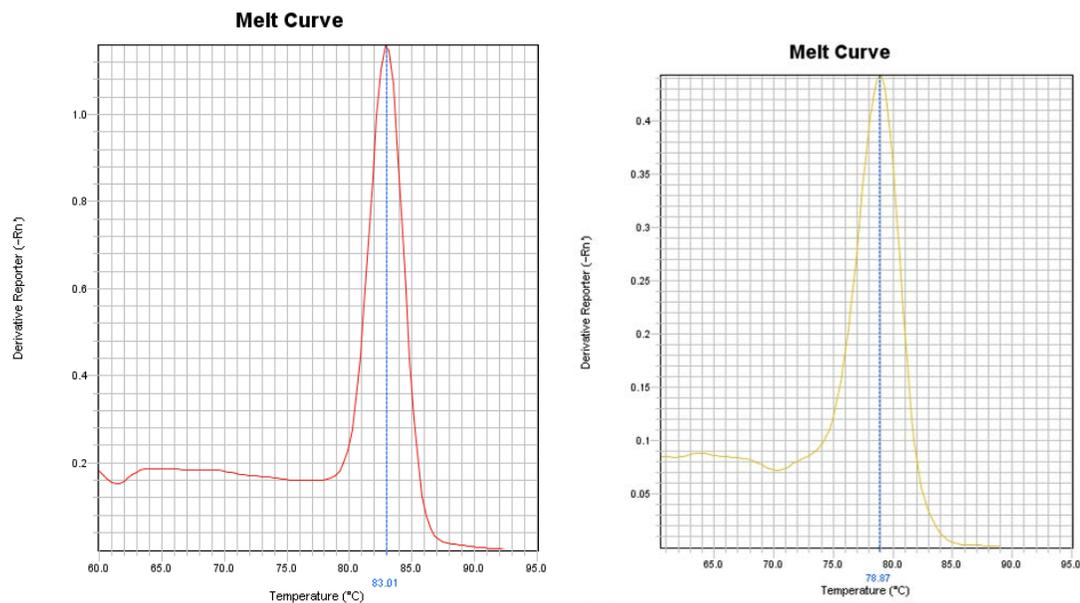
Gambar 20. Visualisasi hasil elektroforesis dari uji konfirmasi primer gen *fim-C Shigella dysenteriae*.

Hasil elektroforesis gel agaros 2% pada gambar 20 menunjukkan bahwa terbentuk pita DNA pada ukuran ± 100 pb. Hal ini menunjukkan ketidaksesuaian

panjang amplicon dari pasangan primer gen *fim-C Shigella dysenteriae* yang dirancang. Primer yang digunakan seharusnya akan menghasilkan pita DNA pada panjang amplicon 153 pb. Hasil visualisasi elektroforesis didukung dengan data BLASTN yang dilakukan untuk mencocokkan fragmen DNA *Shigella dysenteriae* pada urutan (615075 – 615227) pb dengan pasangan primer gen *fim-C* 153 pb *Shigella dysenteriae*. Hasil BLASTN dapat dilihat pada lampiran 6.

Hasil BLASTN menunjukkan terjadinya fragmentasi pada primer *forward* di 9 pb sampai 15 pb primer dan terdeteksi pada sekuen DNA di urutan 49 pb sampai 43 pb. Sementara primer *reverse* menunjukkan homologi pada sekuen DNA di urutan 153 pb sampai 134 pb, sehingga pemanjangan primer *reverse* menuju primer *forward* menghasilkan panjang amplicon 104 pb.

Pengujian amplifikasi dari uji konfirmasi primer juga memberikan informasi terkait *melt curve*. Puncak *melt curve* menunjukkan bahwa primer yang digunakan dapat mengenali DNA tamplat. Gambar 21 merupakan puncak *melt curve* dari masing – masing produk PCR, yaitu sebagai berikut:

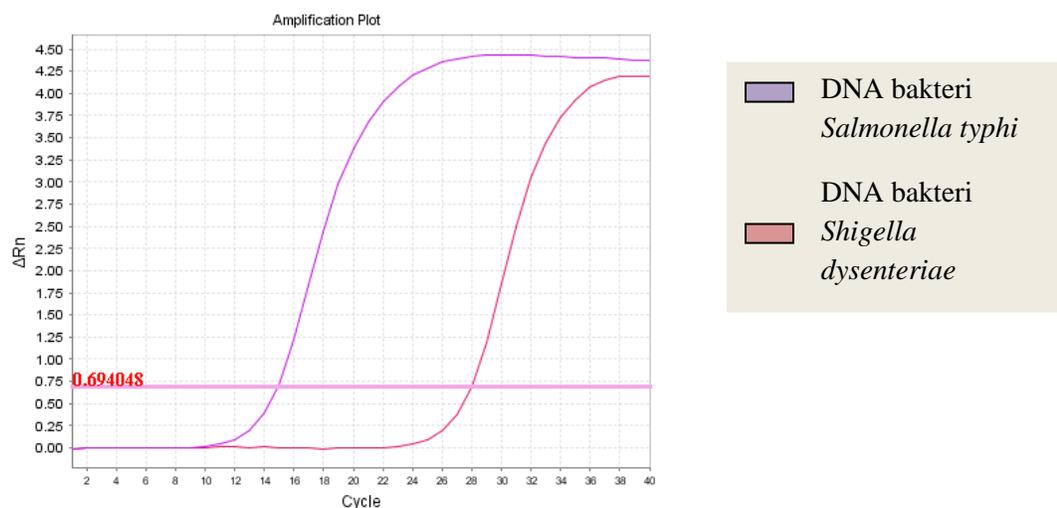


Gambar 21. *Melt curve* hasil uji konfirmasi primer gen *fim-C* (a) *Salmonella typhi* dan (b) *Shigella dysenteriae*.

Berdasarkan gambar 21 a dan b diperoleh bahwa *melt curve* dengan puncak kurva ampikon yang terbentuk dari amplifikasi bakteri *Salmonella typhi* dan primer gen *fim-C Salmonella typhi* terjadi pada *melting temperature* (T_m) $83,01^\circ\text{C}$ sementara primer gen *fim-C Shigella dysenteriae* dengan DNA template *Shigella dysenteriae* terbentuk pada suhu $78,87^\circ\text{C}$ yang merupakan T_m ampikon. Terbentuknya satu puncak *melt curve* mengindikasikan bahwa dari masing – masing primer sampel dapat mengenali DNA template masing – masing sampel pada suhu T_m tersebut, yang dapat digunakan sebagai kekhasan dari primer yang digunakan akan memberikan puncak kurva pelelehan pada suhu tersebut. Terbentuknya satu puncak kurva pada masing – masing sampel juga menunjukkan primer dimer tidak terbentuk selama proses PCR, reagen yang digunakan telah homogen, dan tidak terdapat reagen yang menempel pada dinding *well* 96.

D. Uji spesifisitas primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi*

Uji spesifisitas primer *fim-C* dilakukan untuk mengetahui spesifik primer yang hanya mengenali sampel DNA target dalam proses PCR. Gambar 22 dan table 3 merupakan hasil uji spesifisitas primer gen *fim-C Salmonella typhi* terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.



Gambar 22. Amplifikasi uji spesifisitas primer gen *fim-C Salmonella typhi* terhadap target DNA *Salmonella typhi* dan target DNA *Shigella dysenteriae*.

Tabel 3. Hasil amplifikasi uji spesifisitas primer gen *fim-C Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

Primer gen <i>fim-C</i>	DNA Target	Fluorescent dey	Base line	Treshould cycle (Ct)
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>	SYBR Green 1	0,694048	14,770
	<i>Shigella dysenteriae</i>			27,949

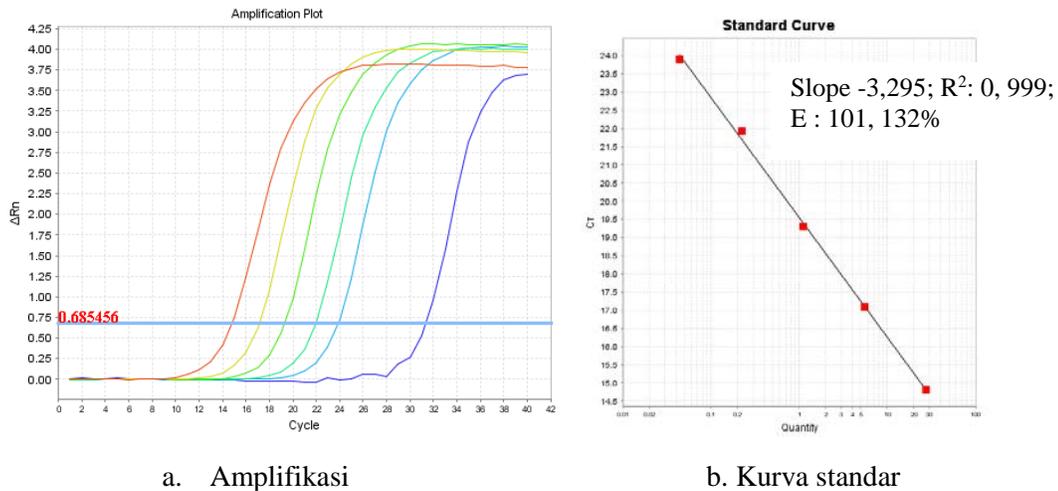
Berdasarkan gambar 22 diperoleh hasil amplifikasi uji spesifisitas primer gen *fim-C Salmonella typhi* menunjukkan bahwa primer gen *fim-C Salmonella typhi* dapat mengenali DNANYA sendiri sebagai DNA target *Salmonella typhi* yang ditunjukkan dengan nilai Ct 14, 770, sementara primer gen *fim-C Salmonella typhi* dianggap tidak dapat mengenali DNA *Shigella dysenteriae* meski terjadi amplifikasi di Ct 27, 949. Hal ini karena selisih amplifikasi yang lebih dari 10 siklus dari amplifikasi sampel primer gen *fim-C Salmonella typhi* dengan DNA target *Salmonella typhi* sesuai dalam buku Dorak tahun (2006), jika Ct suatu sampel positif lebih rendah 10 siklus atau lebih dari Ct sampel negatif atau NTC maka sampel positif teramplifikasi, sehingga dapat disimpulkan bahwa primer gen *fim-C Salmonella typhi* spesifik terhadap bakteri *Salmonella typhi* pada Ct rata-rata 14 siklus.

Apabila dalam suatu kasus keracunan dan dilakukan deteksi dengan menggunakan primer gen *fim-C Salmonella typhi real time PCR*, maka apabila sampel teramplifikasi di siklus ke 14, 770 dan memiliki nilai Tm 83,01 °C maka dapat disimpulkan keracunan disebabkan bakteri *Salmonella typhi*. Jika sampel teramplifikasi di siklus ke 27, 949 dan nilai Tm sebesar 78,87°C maka keracunan disebabkan oleh bakteri *Shigella dysenteriae*.

E. Uji sensitivitas primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi*

Uji sensitivitas primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dilakukan untuk mengetahui limit deteksi primer gen *fim-C Salmonella typhi* terhadap konsentrasi

DNA target *Salmonella typhi*. Gambar 23 dan table 4 merupakan hasil uji sensitivitas primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi*.



Gambar 23. Amplifikasi dan kurva standar uji sensitivitas primer gen *fim-C* *Salmonella typhi* dengan pengenceran 5 tingkat perbandingan 1/5.

Tabel 4. Hasil uji sensitivitas primer gen *fim-C* *Salmonella typhi*

Primer	Konsentrasi DNA (pg/ μ L)	Garis sigmoid	Threshold Cycle(Ct)
gen <i>fim-C</i> <i>Salmonella typhi</i>	2783		14, 80
	556,6		17, 09
	113,2		19, 29
	22,64		21,93
	4,528		23, 90
	NTC		31, 36

Slope : -3, 295; R^2 : 0,999; Eff %: 101,132 %; y-Int : 19,156

Berdasarkan gambar 23 a diperoleh grafik amplifikasi berbentuk sigmoid terdiri atas beragam warna yang masing – masing menandakan pengenceran isolat DNA yang teramplifikasi. Grafik menggambarkan 5 tingkat pengenceran teramplifikasi dengan satu sebagai NTC (kontrol negatif). Pada gambar 23 b menunjukkan kurva standar telah memenuhi standar optimal yang diharapkan dengan nilai *slope* -3, 295,

oleh karena itu nilai efisiensi yang diperoleh sangat baik yaitu 101, 132% dengan nilai R^2 mencapai 0,999. Persamaan dari kurva tersebut yaitu $y = -3,295x + 19, 156$ dengan nilai x adalah log konsentrasi bakteri dan y adalah nilai Ct. Nilai tersebut dapat dihasilkan karena isolat DNA yang digunakan cukup murni.

Kurva standar menunjukkan bahwa konsentrasi bakteri berbanding terbalik dengan nilai Ct. Semakin rendah konsentrasi bakteri maka nilai Ct akan semakin tinggi karena jumlah DNA target lebih sedikit sehingga primer akan membutuhkan waktu yang lama untuk menempel pada DNA target, oleh karena itu nilai Ct setelah pengenceran akan semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan BioRad tahun (2006), jika jumlah cetakan di awal reaksi tersedia banyak maka relatif sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk yang segera terikat oleh sinyal fluoresen, sehingga reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang rendah. Sebaliknya jika yang tersedia sedikit, maka reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang tinggi.

Berdasarkan analisa di atas, maka spesifisitas primer gen *fim-C Salmonella typhi* terhadap DNA target bakteri *Salmonella typhi* sebesar 4,528 pg/ μ L. Hal ini diartikan primer gen *fim-C Salmonella typhi* dapat mendeteksi DNA target sampai konsentrasi DNA terkecil yaitu 4,528 pg/ μ L.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji konfirmasi bakteri, uji isolat DNA bakteri, uji konfirmasi primer, sensitivitas serta spesifisitas primer dapat disimpulkan, primer gen *fim-C Salmonella typhi* spesifik terhadap DNA *Salmonella typhi* dengan nilai rata-rata Ct amplifikasi pada siklus 14, 853, sementara sensitivitas primer tersebut masih dapat mengenali DNA *Salmonella typhi* sampai konsentrasi 4,528 pg/ μ L. Primer gen *fim-C Shigella dysenteriae* dapat mengamplifikasi DNA *Shigella dysenteriae* pada nilai Ct 25, 844, namun hasil amplifikasi *Shigella dysenteriae* setelah dilakukan visualisasi dengan elektroforesis menunjukkan ketiksesuaian amplikon yaitu dibawah 153. Hasil BLASTN primer *forward* gen *fim-C Shigella dysenteriae* terfragmentasi sehingga pemanjangan primer *reverse* menuju primer *forward* menghasilkan panjang amplikon 104 pb.

B. Saran

Pada penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan data kemampuan sensitivitas dan spesifisitanya primer gen *fim-C* bakteri *Shigella dysenteriae* terhadap DNA *Shigella dysenteriae* dan dilakukan sekuensing terhadap amplikon yang dihasilkan sehingga didapatkan data yang komprehensif. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi evaluasi dalam melakukan penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan pengembangan deteksi bakteri patogen.