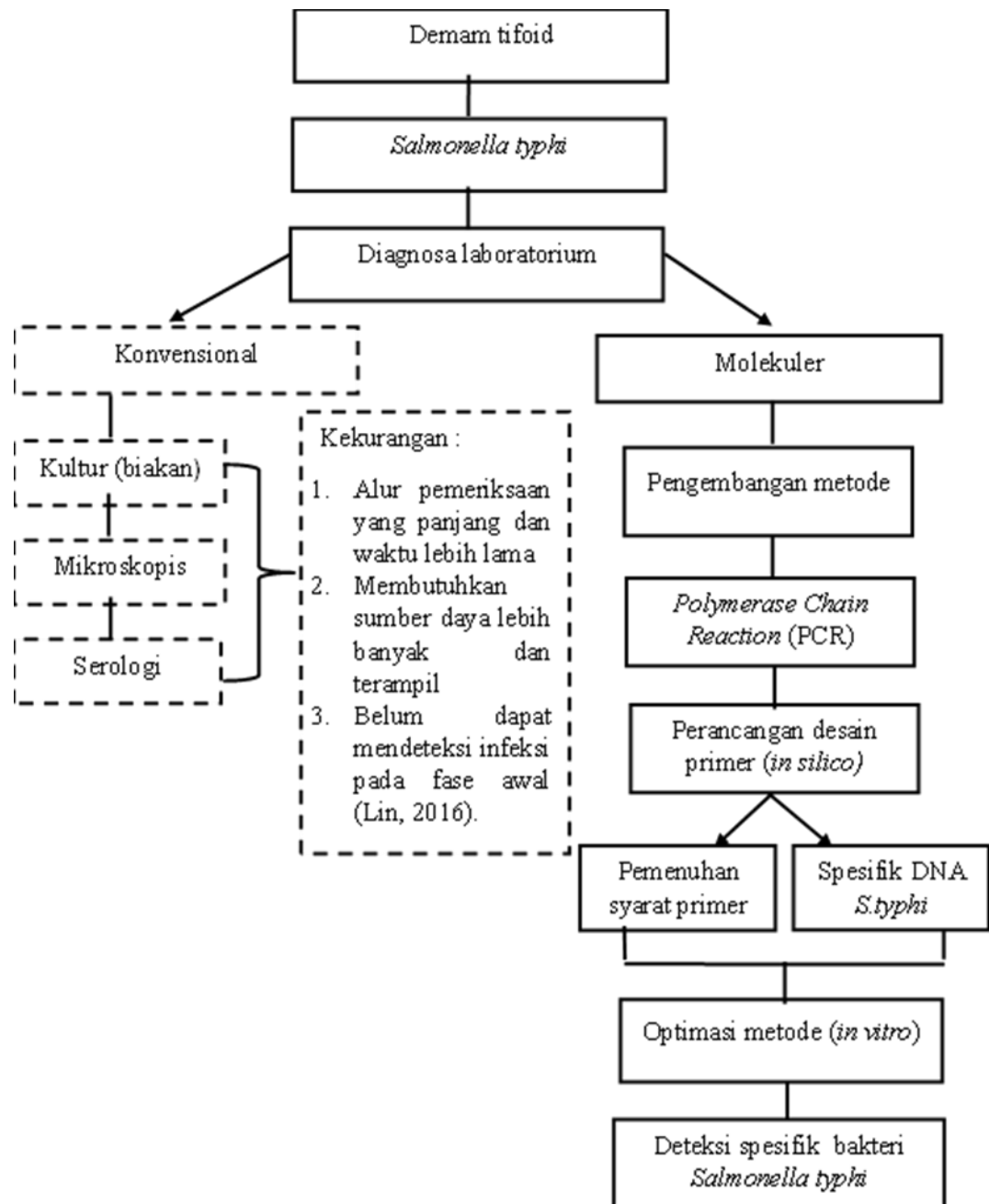


BAB III

KERANGKAP KONSEP

A. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:



: diteliti



: tidak diteliti

Dari kerangka konsep pada gambar 2 diatas dapat dijelaskan bahwa penyakit demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Untuk mengetahui adanya bakteri *Salmonella typhi* pada tubuh, dapat dilakukan diagnosis laboratorium. Terdapat dua metode yang dapat mendeteksi bakteri *Salmonella typhi* yaitu metode konvensional dan molekuler. Metode konvensional meliputi kultur (biakan), secara mikroskopis, dan secara serologi. Sedangkan metode molekuler meliputi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Namun, metode konvensional memiliki beberapa kelemahan yaitu alur pemeriksaan yang panjang dan waktu lebih lama, membutuhkan sumber daya lebih banyak dan terampil, dan belum dapat mendeteksi infeksi pada fase awal (Lin, 2020). Saat ini perlu pengembangan metode diagnostik untuk deteksi *Salmonella typhi* yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan salah satu metode yang mendapatkan hasil pemeriksaan yang lebih cepat dan spesifik.

Perancangan desain primer secara *in silico* merupakan tahap awal dari metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Setelah mendapatkan sepasang primer secara *in silico*, primer di cek apakah sudah memenuhi syarat primer yang sudah ditetapkan. Selanjutnya dilakukan optimasi metode secara *in vitro* untuk deteksi spesifik *Salmonella typhi*.

B. Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Variabel penelitian

Variabel penelitian yang diteliti adalah variable bebas dan variable terikat. Variable bebas pada penelitian ini yaitu desain primer dan optimasi suhu sedangkan variable terikat yaitu spesifik atau tidak spesifik.

2. Definisi operasional variabel

Definisi operasional variabel adalah penjabaran dari variabel tersebut secara praktis dan nyata dalam konteks objek atau subjek yang menjadi fokus penelitian. Ini menjelaskan bagaimana variabel tersebut akan diukur atau diamati secara konkret dalam penelitian. Definisi operasional variabel penelitian memberikan penjelasan tentang indikator-indikator yang digunakan untuk mengukur atau mengamati variabel tersebut. (Fiandara, P., T., 2019). Definisi operasional penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini

: **Tabel 1 Definisi Operasional Variabel**

Variable	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Skala Data
1	2	3	4
Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella enterica typhi</i> adalah bakteri gram negatif yang menyebabkan demam tifoid. Berbentuk batang, dengan ukuran lebar 0,7 - 1,5 μm dengan panjang 2,0 - 5,0 μm .	Pemeriksaan secara molekuler dengan metode PCR.	Nominal
PCR	PCR adalah suatu metode yang dapat digunakan untuk memperbanyak DNA suatu organisme.	Melihat keberadaan DNA dengan UV	Nominal

Metode ini digunakan transluminator untuk identifikasi organisme.			
1	2	3	4
Desain Primer	Merupakan molekul nukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Desain primer yang tepat adalah salah satu faktor yang paling penting dalam keberhasilan sekuensing DNA	Dilakukan secara <i>in silico</i> dengan metode teknologi biofarmatika	Nominal
Reaksi optimasi PCR	Reaksi optimasi PCR adalah proses mencari formolasi untuk mencoba metode PCR agar mendapatkan hasil yang sesuai.	Penambahan jumlah template DNA pada formula PCR, variasi suhu annealing, penambahan waktu annealing dan waktu ekstensi	Nominal

BAB IV

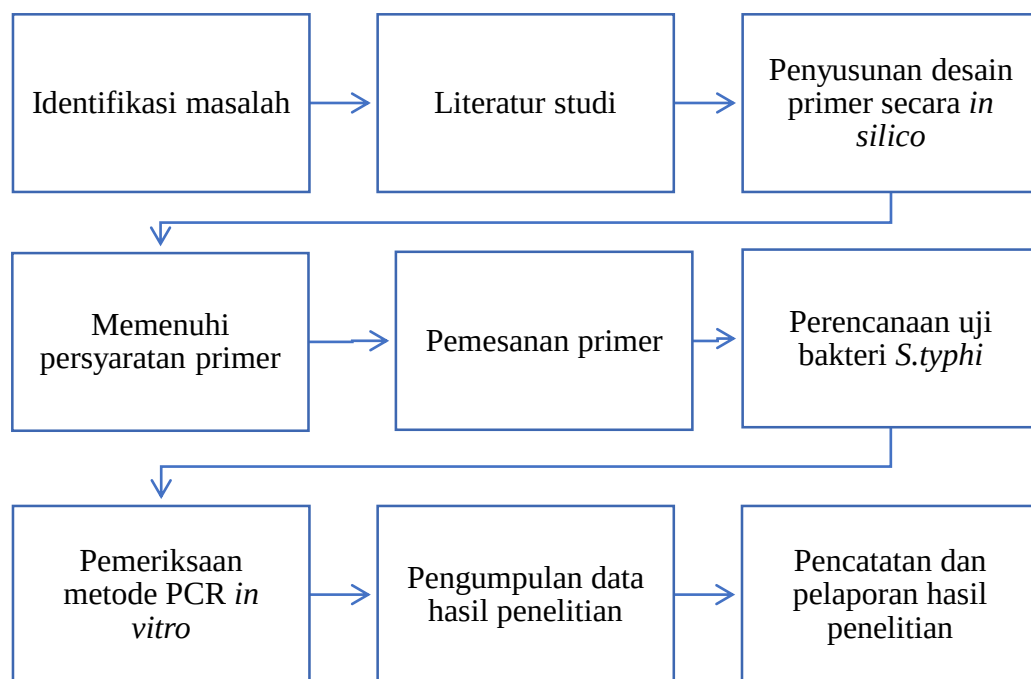
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif dengan metode kualitatif, seperti alur penelitian di bawah (Gambar 3). Pada penelitian ini akan menjelaskan hasil primer yang sudah di desain sebelumnya di NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) untuk deteksi bakteri *Salmonella typhi* secara spesifik.

B. Alur Penelitian

Gambar 3. Alur Penelitian



C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar Jl. Pulau Moyo No. 33 A, Pedungan, Denpasar Selatan dan Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Warmadewa.

2. Waktu penelitian

Lama penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2023 - April 2024.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini mencakup desain primer, optimasi reaksi metode PCR, dan hasil pengujian PCR.

2. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil ekstraksi DNA bakteri sebanyak 10 sampel yang berasal dari kultur *Salmonella typhi* dari 10 biakan.

E. Prosedur Kerja

1. Alat dan bahan

a. Alat

1) Alat ekstraksi DNA

- a) Mikropipet
- b) Waterbath
- c) *Bio Savety Cabinet level II*
- d) Rak *microtube*
- e) *Refrigerated microcentrifuge*

2) Alat analisis hasil ekstraksi kualitatif & kuantitatif

a) Alat ekstraksi uji kualitatif:

Timbangan digital, gelas ukur, gelas piala 250 ml, cetakan gel, magnetic stirrer dan hot plate, tangki elektroforesis dan power suplay serta UV GelDOC.

b) Alat ekstraksi uji kuantitatif:

Alat nanodrop dan personal komputer.

3) Alat reaksi PCR

- a) Tabung Eppendorf
- b) Tip berbagai ukuran
- c) Pipet mikro
- d) Alat sentrifuge
- e) Waterbath

b) Bahan

1) Bahan ekstraksi DNA

- a) Reagen PCIA
- b) Lisis buffer
- c) Tip 100 uL
- d) Tip 1000 uL
- e) Ethanol ACS grade (PA) 96-100%
- f) Microtube steril
- g) Aluminium

2) Bahan analisis hasil ekstraksi hasil kualitatif & kuantitatif

a) Bahan ekstraksi uji kualitatif:

Gel agarose 1,5% (2,25 g agarose + 150 ml dalam 1 x TAE, ethidium bromide, loading dye, marker (100 bp) dan dilution water.

b) Bahan ekstraksi uji kuantitatif:

TE buffer dan sampel DNA.

3) Bahan reaksi PCR

- a) Proteinase K
- b) Etanol
- c) Buffer lisis
- d) H₂O free DNA

- e) KIT PCR (terdiri atas enzim DNA polymerase, dNTPs, buffer 10 x)
 - f) Sepasang primer dengan primer *Forward*
GCGTGGTGAAAGATGCCTTC dengan primer *Reverse*
ATGTCGATGGCCACGGAAAT
 - g) Kontrol positif
 - h) Bakteri *E.coli* sebagai kontrol negatif
- c) **Cara kerja**
- 1) Desain primer secara *in silico*
 - a) Buka website NCBI
 - b) Pilih nucleotide
 - c) Masukkan nama spesies dan gen yang akan dicari, lalu klik enter
 - d) Setelah muncul beberapa pilihan gen, dilihat gen yang berupa DNA dengan melihat keterangan di bagian bawah nama gen. Apabila di akhir pembuatan design primer hingga pengujian apakah primer spesifik atau tidak menggunakan BLAST didapatkan bahwa primer tidak spesifik, tahap ini dapat diulangi dengan memilih gen yang lain agar didapat primer yang spesifik
 - e) Pilih salah satu gen yang berupa DNA
 - f) Setelah muncul informasi mengenai gen yang dipilih, klik “FASTA”, lalu salin gen dan pindahkan di word/notepad
 - g) Kembali ke halaman sebelumnya, lalu di klik tulisan “*PICK PRIMER*” di sebelah kanan
 - h) Pada bagian primer parameter (PCR product size), yaitu ukuran amplifikasi yang akan dihasilkan oleh primer yang disesuaikan dengan rentang ukuran ladder yang digunakan dan mendekati ukuran

gen target yang akan diamplifikasi

- i) Pada bagian Primer Pair Specificity Checking Parameters (database), diisi dengan “genome selected organism”
- j) Pada bagian spesies diisi dengan spesies yang diinginkan (*bacteria*)
- k) Dientang bagian “show result in new tab” lalu pilih “get primer”
- l) Setelah mendapatkan sepasang primer, primer di uji spesifitasnya, dengan membuka web NCBI kembali kemudian pilih menu BLAST
- m) Dicari bagian bawah hingga ditemukan “*primer-BLAST*”, lalu dipilih
- n) Bagian Primer Parameters (*forward dan reverse primer*) diisi dengan primer yang sudah didapatkan sebelumnya
- o) Pada bagian PCR product size disesuaikan dengan rentang ukuran *ladder*
- p) Pada bagian *Primer Pair Specificity Checking Parameters (database)*, diisi dengan “genome selected organism”
- q) Pada bagian spesies diisi dengan spesies yang diinginkan
- r) Dientang bagian “show result in new tab” lalu pilih “get primer”
- s) Sehingga didapatnya sepasang primer yang spesifik sebagai berikut:
Forward : GCGTGGTGAAAGATGCCTTC
Reverse : ATGTCGATGGCCACGGAAAT

2) Peremajaan bakteri *Salmonella typhi*

Satu ose biakan bakteri *Salmonella typhi* diinokulasi pada 10 media XLD (*Xylose Lysine Deoxychoalate agar*). Satu koloni biakan bakteri *Salmonella typhi* menggunakan ose yang sudah dipanaskan dengan api bunsen sampai pijar, kemudian dengan cara streak secara zig zag pada

permukaan media XLD agar dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nawangsih, dkk., 2021).

3) Pembuatan reagen ekstraksi

- a) Larutkan 1,2114 g Tris ke dalam 8 ml aquadest,
- b) Ukur pH dengan kertas indikator pH dan sesuaikan hingga mencapai pH 8 dengan menambahkan HCl pekat tetes demi tetes.
- c) Pastikan volume akhir reagen adalah 10 mL dengan menambahkan aquadest.
- d) Reagen dalam conical tube diautoclave dan disimpan pada suhu ruang.
- e) Buat reagen Tris menjadi 0,5 M.
- f) Timbang 10 g phenol dan tuang ke dalam tabung yang berisi 10 mL reagen 0,05 M TrisCl dengan pH 8.
- g) Homogenkan dengan batuan vortex.
- h) Diamkan selama 1 jam sampai terbentuk 2 lapisan larutan dalam tabung.
- i) Buang supernatant dengan bantuan mikropipet.
- j) Lakukan proses pencucian dengan penambahan larutan TrisCl 0,05M dan homogenkan.
- k) Diamkan sampai terbentuk 2 lapisan dan buang supernatant.
- l) Ukur pH dan pastikan mencapai nilai antara 7 dan 8.
- m) Siapkan tabung conical yang baru.
- n) Buat larutan chloroform : isoamy alcohol dengan perbandingan 24 :
- o) Volume chloroform yaitu 6 ml dan isoamyl alcohol 0,25 ml.
- p) Siapkan tabung conical baru dan pipet 5 ml phenol yang diambil dari dasar larutan phenol dan TrisCl 0,05 M.

- q) Tambahkan 5 ml larutan chloroform : isoamyl alcohol lalu homogenkan
 - r) Tambahkan 5 ml 0,05 M TrisCl.
 - s) Simpan tabung pada lemari pendingin.
- 4) Pembuatan lisis buffer dan proteinase K
- a) Untuk membuat 100 ml lisis buffer, timbang 0,6057 g Tris, 0,1861 EDTA, 0,5844 NaCl, dan 10 ml 10% SDS.
 - b) Masukkan semua bahan ke dalam 50 ml labu ukur dan tambahkan aquadest.
 - c) Homogenkan.
- 5) Tahap persiapan
- a) Siapkan waterbath pada suhu 80°C
- 6) Ekstraksi DNA *Salmonella typhi*
- a) Disiapkan sampel kultur bakteri
 - b) Disiapkan microtube (A) yang berisikan 500 uL lisis buffer
 - c) Diambil 1 koloni tunggal bakteri ke dalam tube
 - d) Tambahkan 12.5 µL of proteinase K (10 mg/mL) kemudian divortex
 - e) Inkubasi di waterbath 80 C selama 30 menit
 - f) Add 500 µL of Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) solution di vortex dan diinkubasi selama for 10 minutes (A)
 - g) Centrifuge at 15,000 G for 5 minutes
 - h) Transfer upper aqueous phase ke 1.5 mL microtube yang baru. (B)
 - i) Tambahkan 700 µL of 96% ethanol at -20 °C, homogenkan kemudian inkubasi -20 °C semalaman
 - j) Centrifuge at 15,000 G selama 10 menit

- k) Hilangkan supernatant 500 μ L of 70% ethanol, homogenkan kemudian inkubasi kembali di suhu 20 °C for 30 minutes
 - l) Centrifuge at 15,000 g selama 5 menit
 - m) Hilangkan supernatant kemudian keringkan pellet DNA selama 15 sampai 30 minutes
 - n) Tambahkan pellet dengan 50 μ L of TE buffer, kemudian dihomogenkan.
- 7) Analisis hasil ekstraksi (kualitatif dan kuantitatif)
- a) Elektroforesis (kualitatif):
 - (1). Agarose seberat 2,25 gram dilarutkan dalam 150 ml 1 X TAE, dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 200°C, dan diaduk selama sekitar 15 menit hingga larutan menjadi bening.
 - (2). Kemudian, ethidium bromida sebanyak 2,5 μ L ditambahkan setelah larutan tersebut didinginkan.
 - (3). Larutan gel dituangkan ke dalam cetakan dan disiapkan dengan sisir untuk membentuk sumur, lalu didiamkan hingga mengeras selama sekitar 20 menit.
 - (4). Setelah gel mengeras, dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis (chamber) dan sisir dilepas dari cetakan. Sampel PCR sebanyak 4 μ L dicampur dengan 1 μ L Loading Dye dan dimuat ke dalam gel..
 - (5). Pengisian sampel dilakukan pada sumur nomor 2 hingga 15, sedangkan pada sumur pertama dimasukkan DNA leader berukuran 100 bp.
 - (6). Selanjutnya, elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt

selama sekitar 30 menit. Visualisasi pita DNA dilakukan menggunakan Geldoc dan hasilnya didokumentasikan. (Hidayati, 2016).

b) Nanodrop (kuantitatif)

- (1). Alat nanodrop dihidupkan dan disambungkan ke komputer.
- (2). Kemudian, TE buffer sebanyak 2 µl diambil untuk digunakan sebagai blanko dalam pengukuran sampel. Setelah blanko menunjukkan nilai 0 ng, pengukuran konsentrasi sampel DNA dilakukan.
- (3). Sampel DNA sebanyak 2 µl diambil dan diletakkan di tempat pembacaan, kemudian alat ditutup dan tombol enter pada komputer yang terhubung dengan program nanodrop ditekan. Konsentrasi DNA dapat dilihat pada layar komputer (Fauziah, 2020).

8) Proses PCR

- a) Proses PCR dimulai dengan menyiapkan sampel, di mana 1 µl DyNAzyme 1U, 39 µl H₂O, 5 µl buffer 10 ×, 1 µl 10mM dNTP Mix, 1 µl primer maju, 1 µl primer mundur, dan 2 µl sampel DNA dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 200 µl.
- b) Untuk memastikan keberhasilan reagen dari kit, digunakan kontrol positif KIT. Reagen-reagen termasuk 0,5 µl DyNAzyme, 40,5 µl H₂O, 5 µl buffer 10 ×, 1 µl 10mM dNTP Mix, 1 µl Primer 1, 1 µl Primer 2, dan 1 µl λ DNA dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Selain itu, digunakan juga kontrol positif sampel dan kontrol negatif untuk memeriksa kualitas PCR.

- c) Proses PCR dimulai dengan tahap denaturasi awal selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus PCR. Setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50°C selama 2 menit, dan pemanjangan rantai pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap pemanjangan rantai akhir dilakukan selama 5 menit pada suhu 72°C.
- d) Selanjutnya, dilakukan optimasi metode PCR. Tahapan optimasi mencakup penambahan jumlah templat DNA dalam formula PCR, variasi suhu annealing, penambahan waktu annealing, dan waktu ekstensi. Optimasi suhu annealing dilakukan pada berbagai suhu berdasarkan rekomendasi dari program desain primer. Suhu annealing yang digunakan harus disesuaikan dengan suhu leleh primer dan panjang primer. Menurut Melati (2022), primer dengan suhu leleh sekitar $\pm 60^{\circ}\text{C}$ memerlukan optimasi suhu annealing antara 55 hingga 65°C.

9) Analisis kualitatif hasil PCR

Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 % yang direndam dalam larutan etidium bromida dan pita-pita DNA diamati dengan bantuan sinar UV menggunakan UV Transilluminator (Rahayu, 2015).

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data dalam penelitian ini menggunakan data primer dan sekunder.

a. Data primer

Dalam penelitian ini, data primer diperoleh secara *in silico*, yaitu melalui

desain primer untuk bakteri *Salmonella typhi* dan hasil amplifikasi DNA.

b. Data sekunder

Dalam penelitian ini, data sekunder berupa sekuen bakteri *Salmonella typhi* yang diperoleh dari GenBank di situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan dengan cara observasi, studi literatur, dan pemeriksaan laboratorium. Berikut teknik pengumpulan data pada penelitian ini:

b. Observasi

Teknik observasi pada penelitian ini adalah berupa pendaran pita DNA pada hasil PCR yang diamati dengan UV-transluminator.

c. Studi literatur

Pada penelitian ini studi literatur dilakukan untuk mengumpulkan data berupa sekuen bakteri dan penyusunan desain primer.

d. Pemeriksaan laboratorium

Pemeriksaan laboratorium pada penelitian ini mencakup PCR dengan optimasi untuk memperoleh metode yang optimal dalam penerapan desain primer sebagai deteksi *Salmonella typhi*.

3. Instrumen pengumpulan data

Berikut instrumen pengumpulan data pada penelitian ini:

- a. Kertas pengamatan, untuk mencatat atau mengumpulkan hasil dan data saat melalui pengamatan pada penelitian di lapangan.
- b. Personel komputer atau laptop, untuk melakukan penelitian secara *in silico*.
- c. *Handphone*, untuk dokumentasi seluruh aktivitas pada saat penelitian berlangsung.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Berikut langkah- langkah pengolahan data yang penulis lakukan:

- a. Pemeriksaan data (*Editing*), merupakan proses melakukan pemeriksaan dan pengumpulan data yang digunakan untuk penelitian.
- b. Pemberian kode (*Coding*), merupakan tahapan kegiatan mengklasifikasikan atau pemberian label pada data, sehingga untuk memudahkan dalam pemilahan data yang diinginkan. Pada penelitian ini pemberian kode dilakukan pada saat optimasi suhu *annealing*, dimana hasil berbagai suhu yang digunakan akan diberi tanda atau label.
- c. Pemasukan data (*Entry*), merupakan tahapan memproses data agar dapat dianalisis. Kertas pengamatan dan hasil dokumentasi penelitian dikumpulkan (Rosadi, dkk., 2021).
- d. Penyusunan data (*Tabulating*), merupakan penyajian data dalam bentuk tabel, gambar, atau daftar untuk memudahkan dalam pengamatan dan evaluasi (Saputro, 2020). Hasil penelitian ini berupa amplifikasi DNA bakteri *Salmonella typhi* dengan primer yang didesain secara *in silico* dengan suhu optimasi yang tepat secara metode PCR.

2. Analisis data

Pada penelitian ini, data dijabarkan berupa tabel, gambar, dan narasi. Data berupa primer yang di desain dengan metode *in silico* pada website NCBI, *primer3plus*, dan *banchling*. Dan pada pendaran pita DNA hasil analisis secara kualitatif dan kuantitatif diproses secara manual dalam bentuk narasi dengankajian pustaka yang sesuai.