

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Desain Primer

Primer pada penelitian ini didesain dengan menggunakan metode *in silico* pada situs NCBI dan *Primer3plus*. Metode ini dilakukan secara bioinformatika dengan memasukkan nama spesies dan gen yang akan dicari yang berupa DNA dengan melihat keterangan di bagian bawah nama gen pada situs NCBI. Dengan hasil sepasang primer yang akan dijabarkan pada Tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Sepasang Primer yang di Rancang pada Situs NCBI & *Primer3plus*

Primer	Sekuen
<i>Forward</i>	5' GCGTGGTGAAAGATGCCTTC3'
<i>Reverse</i>	5' ATGTCGATGGCCACGGAAAT3'

Produk hasil amplikasi dengan menggunakan primer tersebut berdasarkan analisis ini akan didapatkan 367 bp. Pasangan primer tersebut dikarakteristikan pada metode *Primer3plus* didapatkan hasil pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Karakteristik Primer

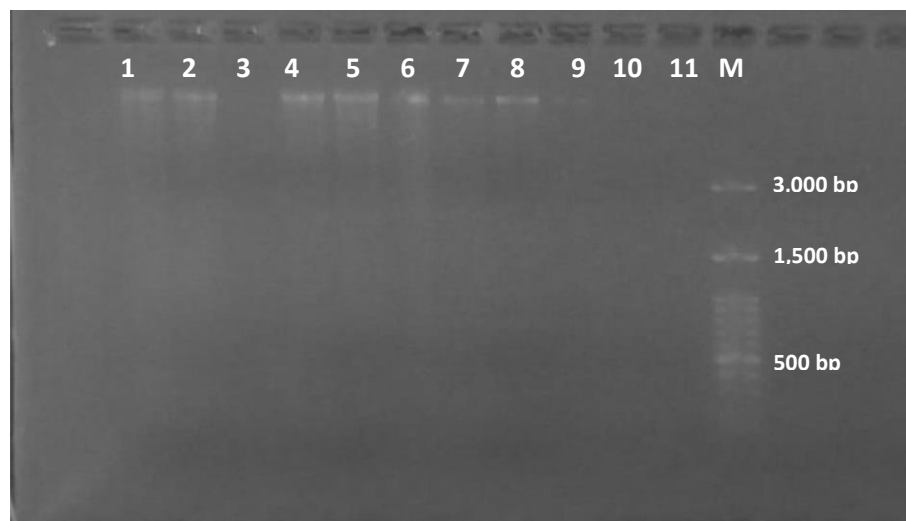
Syarat Primer	Standar	Karakteristik Desain Primer		Kesesuaian
		Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	
Panjang basa	18 – 28 bp	20 bp	20 bp	Sesuai
Presentase G dan C (%GC)	40 – 60%	55%	50%	Sesuai
Titik leleh (Tm)	50 - 65°C	59.8°C	60.1°C	Sesuai
Nilai hairpin	≥ -3 kkal/mol	0	0	Sesuai

Berdasarkan tabel karakteristik primer diatas, kedua pasang primer yang digunakan telah memenuhi syarat untuk pemeriksaan molekuler atau identifikasi bakteri *Salmonella typhi*.

2. Hasil Ekstraksi DNA bakteri

DNA template yang digunakan pada reaksi PCR diekstraksi dengan metode PCIA. DNA diekstraksi dari 11 sampel yang terdiri dari 10 sampel terduga koloni bakteri *Salmonella typhi* yang tumbuh pada media XLD dan 1 sampel ATCC bakteri *Salmonella typhi*. Hasil ekstraksi DNA dianalisis secara kualitatif elektroforesis gel agarosa dan analisis secara kuantitatif nanodrop pada Gambar 4 dan Tabel 4 dibawah ini.

Gambar 4. Hasil Ekstraksi DNA Bakteri terduga *S.typhi*



Ket.: 1: sampel pangan 1; 2 : sampel pangan 2; 3 : sampel pangan 3; 4: sampel pangan 4; 5 : sampel pangan 5; 6 : sampel pangan 6; 7 : sampel pangan 7; 8 : sampel pangan 8; 9 : sampel pangan 9; 10 : sampel pangan 10; 11 : sampel pangan 11; M : marker

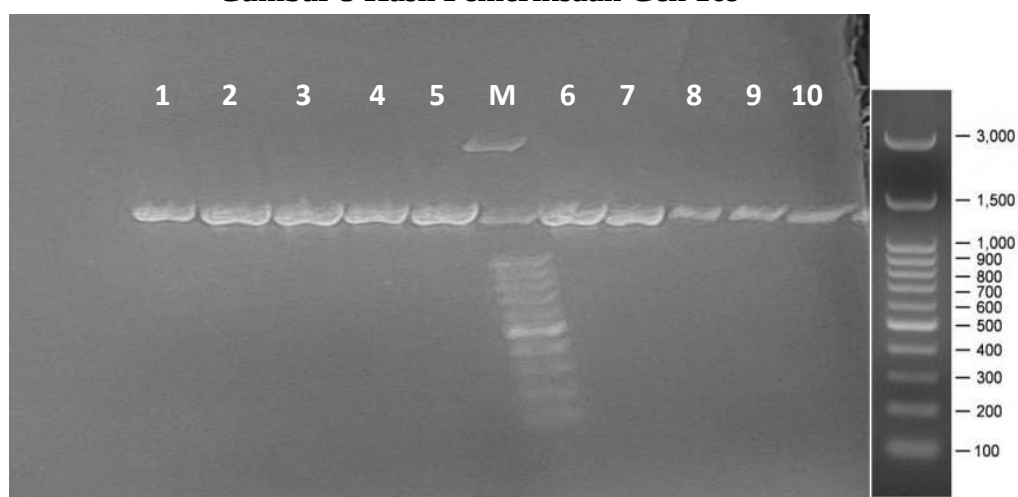
Tabel 4. Hasil Ekstraksi DNA Bakteri

Kode Sampel	Sampel	Hasil Analisis Kualitatif	Hasil Analisis Kuantitatif	
			Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1	DNA Leader			
2	Sampel pangan 1	Tidak terlihat <i>band</i>	29,1	1,33
3	Sampel pangan 2	Tidak terlihat <i>band</i>	15,2	1,23
4	Sampel pangan 3	Terlihat <i>band</i> redup	62,5	1,47
5	Sampel pangan 4	Terlihat <i>band</i>	62,4	1,64
6	Sampel pangan 5	Terlihat <i>band</i> redup		
7	Sampel pangan 6	Terlihat <i>band</i> redup		
8	Sampel pangan 7	smear	116,0	1,74
9	Sampel pangan 8	Terlihat <i>band</i> redup	205,7	1,90
10	Sampel pangan 9	smear	134,2	1,72
11	Sampel pangan 10	Terlihat <i>band</i> redup	108,1	1,75
	Sampel pangan 11	smear	58,7	1,55
		Tidak terlihat <i>band</i>	198,7	1,80
		Terlihat <i>band</i> redup	239,3	1,95
		smear		
		Terlihat <i>band</i> redup		
		smear		

Berdasarkan Gambar 4 dan Tabel 4 di atas, didapatkan bahwa DNA berhasil diekstraksi ditandai dengan munculnya *band*. Dari hasil analisis kuantitatif menggunakan nanodrop *range* konsentrasi yang didapatkan adalah 15,2 – 239,3 ng/μl dengan tingkat kemurnian 1,23 – 1,95.

Berdasarkan hasil ekstraksi di atas didapatkan bahwa beberapa sampel menunjukkan pita yang tidak terlalu jelas, untuk mengkonfirmasi keberadaan DNA pada hasil analisa kualitatif tersebut maka dilakukan PCR dengan uji gen 16s dengan primer gen 16s. Hasil analisa ditunjukkan pada Gambar 5 dan Tabel 5:

Gambar 5 Hasil Pemeriksaan Gen 16s



Ket.: 1: sampel pangan 1; 2 : sampel pangan 2; 3 : sampel pangan 3; 4: sampel pangan 4; 5 : sampel pangan 5; 6 : sampel pangan 6; 7 : sampel pangan 7; 8 : sampel pangan 8; 9 : sampel pangan 9; 10 : sampel pangan 10; M : marker

Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Gen 16s

Kode	Sampel	Hasil (positif: <i>band</i> 1.500 bp)
1	Sampel pangan 1	Positif
2	Sampel pangan 2	Positif
3	Sampel pangan 3	Positif
4	Sampel pangan 4	Positif
5	Sampel pangan 5	Positif
6	Sampel pangan 6	Positif
7	Sampel pangan 7	Positif
8	Sampel pangan 8	Positif
9	Sampel pangan 9	Positif
10	Sampel pangan 10	Positif
11	<i>S. typhi</i> ATCC	Positif

Tabel 5 diatas menunjukkan bahwa semua sampel mengandung DNA bakteri dengan dibuktikan dari hasil positif pada gen 16s, yaitu munculnya *band* pada ukuran 1.500 bp.

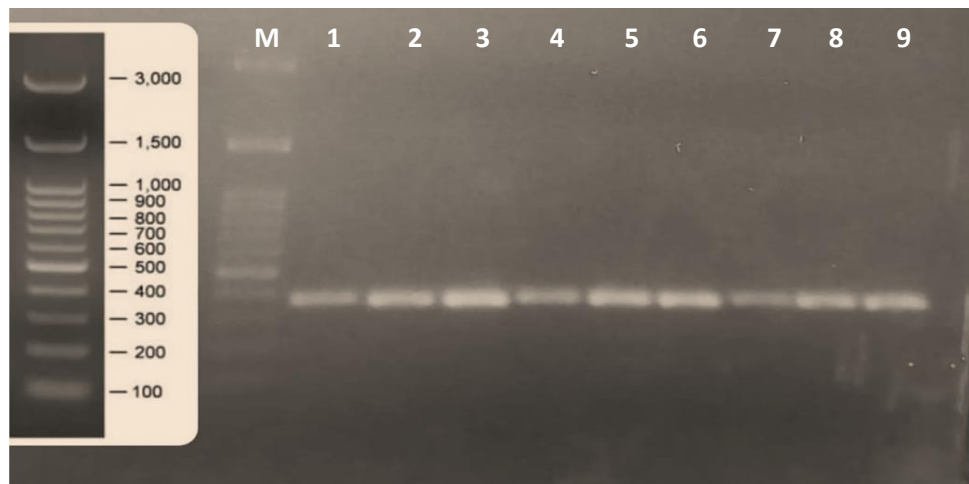
3. Optimasi PCR

Setelah didapatkan DNA tamplate kemudian dilakukan optimasi reaksi PCR.

Optimasi PCR menggunakan DNA tamplate hasil ekstraksi bakteri *Salmonella typhi*

ATCC. Optimasi dilakukan dengan memvariasikan reaksi PCR pada konsentrasi primer, suhu annealing dan siklus. Variasi konsentrasi yang diuji adalah pada konsentrasi primer 300 mM, 400mM, 500mM, dengan suhu annealing 55°C, 60°C, 65°C, dan 35 siklus. Hasil optimasi ditunjukkan pada Gambar 6 dibawah ini:

Gambar 6. Hasil Optimasi PCR



Hasil analisis pada Gambar 6 diatas ditunjukkan pada Tabel 6 dibawah ini:

Tabel 6. Hasil Optimasi PCR

Kode sampel	Jumlah siklus PCR	Konsentrasi primer	Suhu penempelan primer	Hasil pada PCR
1	35	500 mM	65°C	Terdapat 1 <i>band</i> agak redup pada sumur gel
2	35	500 mM	60°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel
3	35	500 mM	55°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel
4	35	400 mM	65°C	Terdapat 1 <i>band</i> agak redup pada sumur gel
5	35	400 mM	60°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel
6	35	400 mM	55°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel

7	35	300 mM	65°C	Terdapat 1 <i>band</i> redup pada sumur gel
8	35	300 mM	60°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel
9	35	300 mM	55°C	Terdapat 1 <i>band</i> pada sumur gel

Berdasarkan hasil tabel diatas, reaksi optimasi yang terbaik adalah reaksi yang menghasilkan satu pita DNA yang paling terang yang ditunjukkan pada sumur 3 dengan reaksi konsentrasi primer 500mM, suhu annealing 55°C, dan 35 siklus.

4. Hasil Identifikasi Isolat Terduga Bakteri *Salmonella typhi* Metode PCR

Hasil identifikasi dengan PCR pada 10 isolat bakteri yang terduga *Salmonella typhi* dari koloni sampel pangan yang terdapat pada laboratorium terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar. Kemudian sampel diekstraksi dengan metode PCIA dan diidentifikasi dengan desain primer spesifik dan reaksi PCR. Hasil pemeriksaan dijabarkan pada Gambar 7 dan Tabel 7:

Gambar 7 Hasil Pemeriksaan Sampel Koloni Terduga Bakteri *S.typhi* dengan Primer Spesifik dan Reaksi PCR



Ket.: 1 : sampel pangan 1; 2 : sampel pangan 2; 3 : sampel pangan 3; 4 : sampel pangan 4; 5 : sampel pangan 5; 6 : sampel pangan 6; M : marker; 7 : sampel pangan 7; 8 : sampel pangan 8; 9 : sampel pangan 9; 10 : sampel pangan 10; 11 : ATCC *S.typhi*; 12 : NTC; 13 : kontrol negatif

Tabel 7 Hasil Pemeriksaan Sampel Koloni Terduga Bakteri *S.typhi* dengan Primer Spesifik dan Reaksi PCR

Kode	Sampel	Hasil Analisis Kualitatif
1	Sampel pangan 1	Negatif
2	Sampel pangan 2	Negatif
3	Sampel pangan 3	Negatif
4	Sampel pangan 4	Terdapat 1 <i>band</i> dengan panjang 1.100 bp
5	Sampel pangan 5	Terdapat 3 <i>band</i> dengan panjang 700 bp, 1.100 bp, 367 bp
6	Sampel pangan 6	Terdapat 3 <i>band</i> dengan panjang 700 bp, 1.100 bp, 367 bp
7	Sampel pangan 7	Terdapat 1 <i>band</i> dengan panjang 700 bp
8	Sampel pangan 8	Terdapat 1 <i>band</i> dengan panjang 700 bp
9	Sampel pangan 9	Terdapat 3 <i>band</i> dengan panjang 700 bp, 1.100 bp, 367 bp
10	Sampel pangan 10	Terdapat 1 <i>band</i> dengan panjang 700 bp
11	<i>S.typhi</i> ATCC	Positif
12	NTC	Negatif
13	Kontrol negatif	Negatif

Berdasarkan Gambar 7 dan Tabel 7 di atas primer yang menunjukkan pita DNA tunggal berada pada kisaran 367 bp pada ATCC *Salmonella typhi* sebagai control positif. Sampel pangan pada sumur 1, 2, dan 3 tidak terdapat pita yang artinya sampel tersebut negatif. Sedangkan pada sampel pangan 5, 6, dan 9, ditemukan lebih dari 1 pita DNA, yang menggambarkan bahwa ada DNA yang teramplifikasi menggunakan primer yang didesain.

B. Pembahasan

1. Desain Primer

Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri dari sekitar

30 basa dan memiliki peran penting dalam proses PCR (Salsabila, dkk., 2021). Primer didesain untuk keperluan identifikasi bakteri *Salmonella typhi* secara molekuler, pada bidang ini primer didesain dengan menggunakan metode *in silico* pada situs NCBI dan *Primer3plus* secara bioinformatika.

Desain primer diawali dengan pencarian sekuens nukleotida bakteri *salmonella typhi* pada situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Setelah didapat sekuens nukleotida pada situs NCBI, kemudian disalin bagian “FASTA” dan dianalisis pemilihan kandidat primer *forward* dan *reverse* pada situs *Primer3plus* (Syaputra dkk.). Primer terpilih dengan sekuens berukuran 367 bp. Selain analisis pemilihan kandidat primer, karakteristik primer dapat dianalisis pada situs *Primer3plus*. Pasangan desain primer yang terpilih yaitu *forward* 5’ GCGTGGTGAAAGATGCCTTC3’ dan *reverse* 5’ ATGTCGATGGCCACGGAAAT3’.

Aspek yang perlu dipertimbangkan dalam penentuan primer meliputi panjang primer, temperatur leleh (T_m), kandungan GC, dan ikatan pada ujung 3’. Primer yang optimal memiliki panjang antara 18 hingga 30 pasang basa. Panjang primer melebihi 30 pasang basa dapat mengakibatkan penempelan primer yang tidak spesifik. Perbedaan T_m antara primer maju dan primer mundur sebaiknya sekitar 5°C untuk meminimalkan potensi penurunan dalam proses amplifikasi. Selain itu, perbandingan antara jumlah basa G dan C dalam primer perlu diperhatikan karena hal ini dapat memengaruhi T_m primer. Idealnya, primer yang baik memiliki persentase basa G dan C sekitar 40-60% (Saraswati dkk., 2019).

2. Hasil Ekstraksi DNA Bakteri *Salmonella typhi*

DNA diekstraksi dengan tujuan untuk menyediakan template reaksi PCR, hasil ekstraksi berdasarkan gambar 4 DNA berhasil diekstraksi dengan ditunjukkan adanya pita DNA.

Metode PCIA adalah *gold standar* untuk ekstraksi DNA. Dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA dari darah, kultur suspensi, atau homogenat jaringan. Ini memberikan hasil yang tinggi dan relatif murah. Namun, sifat racun dari fenol dan kloroform mengharuskan penggunaan lemari asam dan merupakan keterbatasan utama dalam metode ini. Sampel DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian lebih tinggi dibandingkan metode konvensional lainnya tetapi lebih rendah (Dairawan, dkk., 2020).

Setelah isolat bakteri terduga *Salmonella typhi* diekstraksi, hasil ekstraksi di analisis secara kualitatif elektroforesis dan kuantitatif nanodrop. Hasil dari analisis kualitatif pada gel agarose tidak semua sampel menghasilkan *band*, Hal ini bisa disebabkan oleh kedua sampel DNA tersebut memiliki tingkat kemurnian dan konsentrasi yang rendah. Hanya dua sampel yang memenuhi syarat tingkat kemurnian yang ditetapkan dalam hasil analisis kuantitatif nano drop. Prinsip kerja spektrofotometri nano drop adalah DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet karena mengandung basa purin dan pirimidin. Hasil uji nano drop mencakup nilai kemurnian DNA yang diukur dengan rasio A260/A280 dan konsentrasi DNA. DNA yang berkualitas baik, menurut uji nano drop, memiliki kemurnian antara 1,8 hingga 2,0 (Hikmatyar, dkk., 2015). Rasio 260/280 adalah parameter yang umum digunakan untuk menilai kemurnian asam nukleat. Rasio ini sering digunakan untuk mendeteksi keberadaan protein atau fenol dalam sampel asam nukleat yang diisolasi (Sophian, dkk., 2023). Jika DNA terkontaminasi dengan protein atau polisakarida, nilai absorbansinya biasanya kurang dari 1,8, sementara jika terkontaminasi dengan RNA, nilai absorbansinya biasanya lebih dari 2,0 (Dewanata, dkk., 2021).

Hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan uji keberadaan gen 16s rRNA. Gen 16s adalah subunit yang dapat ditemukan pada seluruh bakteri. Maka dari itu sampel hasil

ekstraksi di uji gen 16s rRNA untuk mengetahui apakah pada sampel hasil ekstraksi terdapat DNA bakteri atau tidak. Setelah diuji dengan gen 16s sampel menunjukkan pita DNA pada gel elektroforesis dengan panjang 1.500 bp. Dengan demikian hasil ekstraksi dikatakan berhasil dengan adanya pita DNA bakteri.

3. Hasil Optimasi PCR

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan reaksi terbaik sebelum PCR dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan optimasi pada variasi konsentrasi yang di uji adalah pada konsentrasi primer 300 mM, 400mM, 500mM, dengan suhu annealing 55°C, 60°C, 65°C, dengan 35 siklus. Optimasi dilakukan pada sampel ATCC bakteri *Salmonella typhi*.

Produk PCR yang dihasilkan kemudian dielektroforesis untuk mengetahui apakah primer dapat mendeteksi bakteri *Salmonella typhi* atau tidak. Hasil elektroforesis dianalisis dengan memeriksa ketebalan pita secara visual. Pita optimal adalah pita yang tebal, tunggal, dan sesuai dengan ukuran yang diharapkan. Konsentrasi primer dan suhu annealing yang menghasilkan pita optimal tersebut akan digunakan dalam proses PCR pada sampel penelitian selanjutnya (Setyawati, dkk., 2021).

Hasil optimasi pada sampel ATCC bakteri *Salmonella typhi* pada gel elektroforesis didapatkan *band* tunggal pada Gambar 6. *Band* DNA yang paling terang dan jelas dipilih sebagai optimasi yang optimal untuk sampel yang akan diuji dengan metode PCR nanti yaitu pada sumur 3 dengan reaksi konsentrasi 500mM, suhu annealing 55°C dengan 35 siklus.

Beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan PCR meliputi konsentrasi dan kualitas DNA, suhu annealing primer, konsentrasi MgCl₂, enzim polimerase, konsentrasi dan kualitas primer, jumlah siklus PCR, deoksinukleotida triphosphate

(dNTP), serta faktor-faktor lain seperti larutan buffer (Setyawati, dkk., 2021).

4. Hasil Identifikasi Isolat Terduga Bakteri *Salmonella typhi* dengan Metode PCR

Berdasarkan Gambar 7 bahwa terdapat hasil yang bervariasi pada identifikasi bakteri *Salmonella typhi* dengan metode PCR. Pada metode ini digunakan kontrol positif berupa bakteri *Salmonella typhi* ATCC. Hasil PCR dengan sampel ini didapatkan pita DNA tunggal yang berukuran 367 bp, sesuai dengan perkiraan produk yang dihasilkan dari desain primer yang dibuat.

Pada sampel pangan 1,2,3 tidak ditemukan pita DNA, hal ini menandakan primer tidak mendeteksi genom bakteri *Salmonella typhi* pada DNA template. Hasil yang berbeda didapatkan pada sampel 4-10. Pada sampel-sampel tersebut terdapat pita DNA dengan jumlah pita lebih dari satu dan tidak identik dengan bakteri *Salmonella typhi* ATCC. Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat yang terduga *Salmonella typhi* pada metode kultur berdasarkan pemeriksaan PCR dengan primer yang didesain adalah negative *Salmonella typhi*.

Ada berbagai kemungkinan dihasilkan pita DNA pada sampel-sampel tersebut, antara lain adalah primer bisa mengenali bakteri yang berkerabat dekat dengan *Salmonella typhi*. Hasil analisis saat mendesain primer menunjukkan bahwa desain tersebut masih bisa mengenali jenis bakteri lain yang berkerabat dekat dengan bakteri *Salmonella typhi*. Untuk memastikan jenis bakteri tersebut bisa dilakukan dengan metode pemeriksaan sekuensing.

Penelitian lain juga melakukan identifikasi *Salmonella typhi* dengan metode PCR antara lain, penelitian Hermono, dkk (2017) melakukan Identifikasi *Salmonella* sp pada Jajanan Jus Buah di Kecamatan Gunungpati Semarang dengan PCR. Penempatan primer pada urutan basa nukleotida tertentu pada DNA yang menjadi

target untuk *Salmonella* spesifik, sehingga hanya bagian yang spesifik tersebut yang akan mengalami amplifikasi. Dalam keempat belas sampel lainnya, tidak teramati adanya pita DNA dengan panjang 244 bp, menunjukkan ketiadaan kontaminasi oleh *Salmonella* sp. Hal ini diperkuat oleh keberadaan pita DNA dengan panjang 244 bp pada kontrol positif (*Salmonella typhimurium*), sementara kontrol negatif (*Escherichia coli*) tidak menunjukkan adanya pita dengan panjang 244 bp.

Badri, dkk (2019), melakukan penelitian Studi Perbandingan Uji Serologis, Teknik Kultur dan Deteksi Molekuler *Salmonella Typhi* pada Pasien Demam di Negara Bagian Khartoum, Sudan. Isolasi darah dan kotoran bakteri dan deteksi PCR menunjukkan pita DNA dengan ukuran 203 bp sehingga dinyatakan positif bakteri *Salmonella typhi*.

Mustika, dkk (2019) melakukan penelitian Identifikasi Gen *fliC Salmonella typhi* pada Susu Kedelai dengan Metode PCR dengan hasil PCR dan elektroforesis gel menunjukkan hasil positif pada setiap sampel yaitu, Sk1, Sk2, Sk3, dan Sk4 ditandai dengan adanya band DNA pada ukuran 1500 bp.

Pada penelitian ini telah berhasil mendesain primer dan mampu mendeteksi bakteri *Salmonella typhi* secara spesifik dengan dihasilkan DNA tunggal pada bakteri ATCC *Salmonella typhi*, namun desain primer ini masih mampu mengenali bakteri lain yang berkerabat dekat dengan *Salmonella typhi* sehingga perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut dengan metode *Nested PCR*.