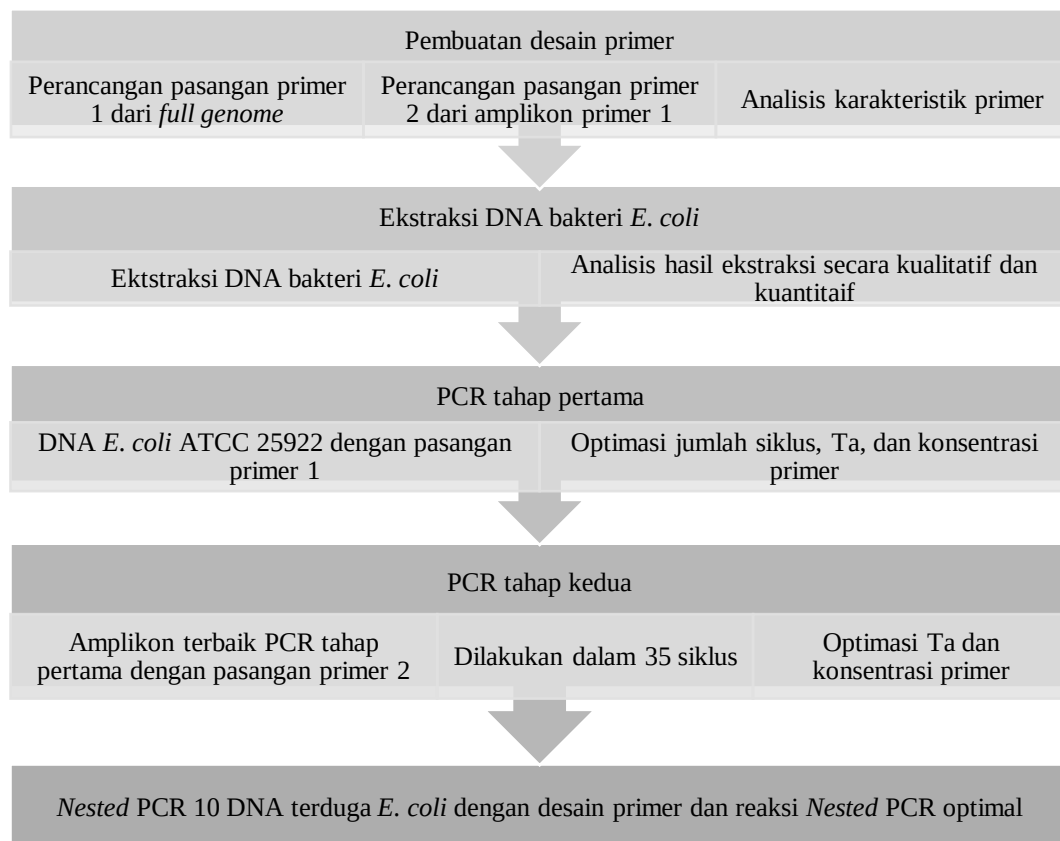


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

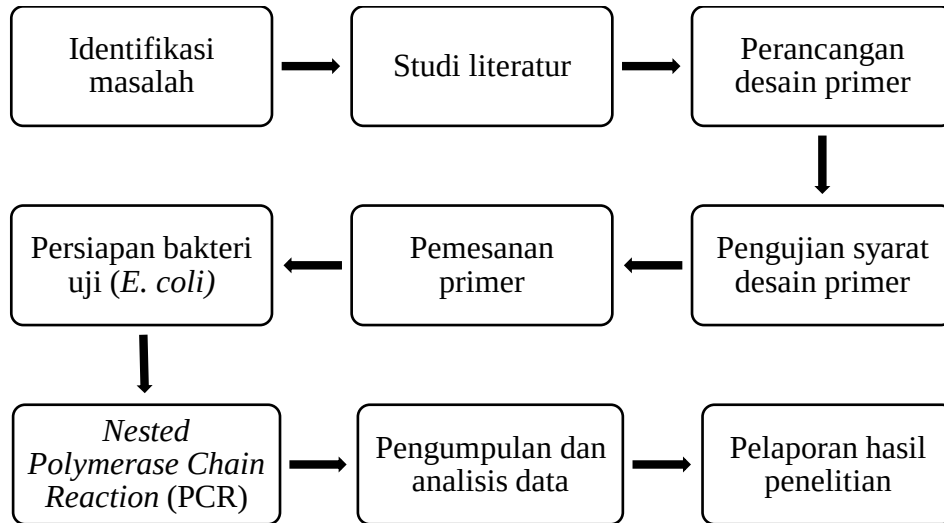
Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian kuantitatif deskriptif. Penelitian kuantitatif deskriptif merupakan jenis penelitian yang memberikan gambaran terhadap suatu data-data berupa angka yang dianalisis dan dibahas sebagai narasi dan bukan merupakan pembuktian dari sebuah hipotesis (Zellatifanny, 2018). Penelitian ini menerapkan metode *in silico* dalam perancangan dan analisis desain primer dan metode *in vitro* pada optimasi metode *Nested* PCR dalam mendeteksi bakteri *E. coli* secara spesifik. Desain penelitian dapat dilihat pada gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3 Desain Penelitian

B. Alur Penelitian

Alur penelitian dijabarkan pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan dua metode, yaitu secara *in silico* menggunakan perangkat lunak serta secara *in vitro* di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar dan Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Warmadewa.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan April tahun 2024.

D. Sampel Penelitian

2. Unit analisis

Unit analisis merupakan satuan tertentu yang dijadikan objek penelitian. Unit analisis pada penelitian ini yaitu desain primer, optimasi metode *Nested* PCR, bakteri *E. coli*, dan hasil uji *Nested* PCR.

3. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu DNA bakteri *E. coli* yang diekstraksi dari koloni murni bakteri *E. coli* ATCC 25922 sebanyak 1 sampel dan DNA bakteri *E. coli* yang diekstraksi dari koloni terduga *E. coli* yang diremajakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar sebanyak 10 sampel.

E. Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian, yaitu laptop, indikator pH, *conical tube*, *autoclave*, *vortex*, *magnetic stirrer*, neraca analitik, mikropipet, gelas ukur, erlenmeyer, oven, *Bio Safety Cabinet*-level II, rak *microtube*, *refrigerated microcentrifuge*, PCR tube, alat *thermocycler* PCR, *UV work station*, alat elektroforesis, dan UV-transluminator

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian, yaitu tris, HCl pekat, *phenol*, *chloroform*, *isoamyl alcohol*, SDS, EDTA, NaCl, proteinase K, Tip 10 µl, Tip 100 µl, Tip 1000 µl, *ethanol ACS grade* (PA) 96-100%, *microtube sterile*, PCR tube steril, SDS, ose steril, media EMBA, stock gliserol *Escherichia coli* ATCC 25922, koloni terduga *E. coli* dari sampel pangan, TE buffer, *aquadest*, SensiFAST™ SYBR No-ROX Mix, ddH₂O, pasangan primer pertama dengan primer F1 TCTCCGTGAAGCTGGTTTCC dan primer R1 GCGACCAATCAGATCCACCA, serta pasangan primer kedua dengan primer F2 ATCGGTGAAATACGCAGGCT dan primer R2 TCGTCACCTTGAATGGCAGG, pangan, gel agarose, dan TAE.

3. Pre analitik

Tahap pre analitik meliputi:

- a. Disinfeksi daerah kerja
- b. Persiapan alat kerja (disinfeksi dan/atau sterilisasi alat serta dilakukan *setting* alat sesuai keperluan)
- c. Persiapan reagen (disuhu ruangan, di-*aliquot* sesuai keperluan)
- d. Persiapan media peremajaan bakteri
- e. Penggunaan alat pelindung diri

4. Analitik

- a. Desain primer dengan analisis *in silico*

Desain primer diawali dengan pencarian full genome bakteri *Escherichia coli*. Pencarian ini dapat dilakukan melalui *GenBank* pada laman NCBI (Clark *et al.*, 2016). FASTA dari *full genome* yang didapat kemudian disejajarkan dengan FASTA *full genome* bakteri lain yang memiliki kemiripan tinggi dengan *Escherichia coli*. Pada penelitian ini, *full genome* dari *E. coli* disejajarkan dengan *full genome* bakteri *Shigella sp.* Karena terbukti memiliki kemiripan tinggi (Putri, 2021). Perancangan primer dilakukan menggunakan sekuen yang memiliki banyak perbedaan setelah disejajarkan. Desain primer dibuat dan dianalisis secara *in silico*. Desain primer dibuat dan dianalisis karakteristiknya pada laman Primer3plus (Sihotang dkk., 2021). Selain informasi pada laman Primer3, karakteristik primer dapat dilihat secara *in silico* pada laman benchling (Novarina *et al.*, 2022).

Desain primer dibuat sebanyak 2 pasang, terdiri dari 2 primer *forward* dan 2 primer *reverse*. Pasangan primer kedua dirancang menggunakan produk yang dihasilkan oleh pasangan primer pertama. Setelah kedua pasang primer didapatkan,

maka perlu dilakukan pengecekan spesifisitas primer untuk memastikan bahwa pasangan primer kedua sudah tidak komplemen pada sekuen gen organisme selain *E. coli* yang sebelumnya komplemen pada pasangan primer pertama. Pengecekan ini dapat dilakukan pada Primer BLAST NCBI (Saraswati dkk., 2019).

b. Peremajaan bakteri *Escherichia coli*

Disiapkan 11 media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). 1 media digunakan untuk inokulasi stock bakteri *E. coli* ATCC 25922 dan 10 media lainnya digunakan untuk peremajaan koloni terduga *E. coli* yang diambil dari sampel pangan. Koloni yang diambil untuk diremajakan memiliki ciri-ciri berwarna hijau metalik berinti gelap dengan kilap logam pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Pekerjaan ini dilakukan dengan aseptik di dekat api bunsen. Cawan petri dibungkus dengan kertas, diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam (Rosmania dkk, 2020).

c. Pembuatan reagen ekstraksi *Phenol Chloroform Isoamy Alcohol* (PCIA) (McKiernan et al, 2017).

- 1) Larutkan 1,2114 g Tris ke dalam 8 ml aquadest,
- 2) Ukur pH dengan kertas indikator pH dan sesuaikan hingga mencapai pH 8 dengan menambahkan HCl pekat tetes demi tetes.
- 3) Pastikan volume akhir reagen adalah 10 mL dengan menambahkan aquadest.
- 4) Reagen dalam conical tube diautoclave dan disimpan pada suhu ruang.
- 5) Buat reagen Tris menjadi 0,5 M.
- 6) Timbang 10 g phenol dan tuang ke dalam tabung yang berisi 10 mL reagen 0,05 M TrisCl dengan pH 8 dan homogenkan dengan batuan vortex.
- 7) Diamkan selama 1 jam sampai terbentuk 2 lapisan larutan dalam tabung.
- 8) Buang supernatant dengan bantuan mikropipet.

- 9) Lakukan proses pencucian dengan penambahan larutan TrisCl 0,05 M dan homogenkan.
- 10) Diamkan sampai terbentuk 2 lapisan dan buang supernatant.
- 11) Ukur pH dan pastikan mencapai nilai antara 7 dan 8.
- 12) Siapkan tabung conical yang baru.
- 13) Buat larutan chloroform : isoamy alcohol dengan perbandingan 24 : 1. Volume chloroform yaitu 6 ml dan isoamyl alcohol 0,25 ml.
- 14) Siapkan tabung conical baru dan pipet 5 ml phenol yang diambil dari dasar larutan phenol dan TrisCl 0,05 M.
- 15) Tambahkan 5 ml larutan chloroform : isoamyl alcohol lalu homogenkan
- 16) Tambahkan 5 ml 0,05 M TrisCl.
- 17) Simpan tabung pada lemari pendingin.

d. Pembuatan lisis buffer

- 1) Untuk membuat 100 ml lisis buffer, timbang 0,6057 g Tris, 0,1861 EDTA, 0,5844 NaCl, dan 10 ml 10% SDS.
- 2) Masukkan semua bahan ke dalam 50 ml labu ukur dan tambahkan aquadest.
- 3) Homogenkan.

e. Pembuatan gel agarose

Gel agarose 1,5% dibuat dengan melarutkan 2,25 gram agarose dalam 150 ml TAE 1x kemudian dihomogenkan pada *magnetic stirrer* dengan suhu 150°C dan kecepatan 600 rpm hingga larutan menjadi bening. Larutan didiamkan hingga suhunya menjadi hangat kemudian ditambahkan 6 µl *staining gel* dan dihomogenkan dengan menggoyangkan erlenmeyer secara perlahan. Selanjutnya gel agarose dituang ke cetakan (Anissa dkk., 2024). Sisir dipasang saat penuangan

agar sebagai sumur yang akan digunakan untuk sampel. Gel ditunggu hingga mengeras kurang lebih 20 menit, kemudian direndam dengan *buffer* TAE 1X (Pertiwi dkk., 2020).

f. Ekstraksi DNA *Escherichia coli*

Ekstraksi DNA bakteri *E. coli* pada penelitian ini menggunakan metode PCIA (McKiernan, *et al.*, 2017) yang dioptimasi.

- 1) Disiapkan sampel kultur bakteri,
- 2) Disiapkan microtube (A) yang berisikan 500 uL lisis buffer.
- 3) Diambil 1 koloni tunggal bakteri ke dalam tube.
- 4) Tambahkan 12.5 µL of proteinase K (10 mg/mL) kemudian dihomogenkan dengan vortex.
- 5) Inkubasi di oven dengan suhu 56°C selama 30 menit dan dihomogenkan menggunakan vortex setiap 10 menit.
- 6) tambahkan 500 µL reagen PCIA kemudian homogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 10 menit (A).
- 7) Sentrifus pada kecepatan 15,000 G selama 5 menit.
- 8) Pindahkan 1.5 mL lapisan atas larutan ke dalam *microtube* yang baru. (B).
- 9) Tambahkan 700 µL etanol 96%, homogenkan kemudian inkubasi pada suhu - 20°C selama 24 jam (semalaman).
- 10) Sentrifus dengan kecepatan 15,000 G selama 10 menit.
- 11) Hilangkan *supernatant* kemudian tambahkan 500 µL etanol 70%, homogenkan kemudian inkubasi kembali di suhu 20 °C selama 30 menit.
- 12) Sentrifus dengan kecepatan 15,000 g selama 5 menit.
- 13) Hilangkan *supernatant* kemudian keringkan pellet DNA selama 15 – 30 menit

14) Tambahkan pellet dengan 50 μ L TE buffer, kemudian dihomogenkan.

g. Analisis hasil ekstraksi

Analisis hasil ekstraksi bertujuan untuk memastikan keberhasilan proses ekstraksi. Analisis dilakukan secara kualitatif dengan gel agarose dan analisis secara kuantitatif dilakukan dengan pemeriksaan menggunakan alat nanodrop spektrofotometer (Nugroho dkk., 2017).

h. Uji *Nested* PCR dengan optimasi

Optimasi *Nested* PCR dilakukan pada sampel DNA *E. coli* murni (ATCC) 25922. Optimasi *Nested* PCR dilakukan pada jumlah siklus *Nested* PCR tahap pertama, konsentrasi dan suhu *annealing* primer pertama untuk *Nested* PCR tahap pertama, serta konsentrasi dan suhu *annealing* primer kedua untuk *Nested* PCR tahap kedua. Variasi jumlah siklus *Nested* PCR tahap pertama yaitu 35 siklus, 30 siklus, dan 20 siklus. Variasi suhu *annealing* ditentukan dengan perhitungan rata-rata melting temperature primer (T_m) primer *forward* dan primer *reverse* kemudian dihitung menggunakan rumus $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ hingga $(T_m + 5)^\circ\text{C}$. Variasi suhu *annealing* yang digunakan yaitu 55°C , 60°C , dan 65°C . Konsentrasi primer digunakan sebagaimana panduan pada SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit yaitu konsentrasi primer 300 mM, 400 mM, dan 500 mM. *Reaction mix* yang digunakan dalam satu kali reaksi PCR terdiri atas *master mix*, primer *forward*, primer *reverse*, template yang diperoleh dari hasil ekstraksi DNA dan ddH₂O. Optimasi dilakukan dalam dua tahap. Pada hasil optimasi PCR tahap pertama, dipilih reaksi PCR terbaik untuk dijadikan template PCR tahap kedua. Adapun komposisi *reaction mix* PCR dalam satu kali reaksi dengan volume total sebesar 20 μ L untuk *Nested* PCR tahap pertama ditunjukkan pada Tabel 2 bawah ini.

Tabel 2
Komposisi Reaksi *Nested* PCR Tahap 1

Reagen	Konsentrasi		
	Tube 1	Tube 2	Tube 3
2X SensiFAST™ SYBR No-ROX Mix	1X	1X	1X
20 µM forward primer	300 nM	400 nM	500 nM
20 µM forward primer	300 nM	400 nM	500 nM
Template (DNA <i>E. coli</i>)	(@ 5 µL)		
H ₂ O	Hingga mencapai 20 µL		
	20 µL Final Volume		

(SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit)

Komposisi *reaction mix* PCR satu kali reaksi dengan volume total sebesar 20 µl untuk *Nested* PCR tahap kedua ditunjukkan pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3
Komposisi Reaksi *Nested* PCR Tahap 2

Reagen	Konsentrasi		
	Tube 1	Tube 2	Tube 3
2X SensiFAST™ SYBR No-ROX Mix	1X	1X	1X
20 µM forward primer	300 nM	400 nM	500 nM
20 µM forward primer	300 nM	400 nM	500 nM
Template (amplikon terbaik PCR tahap 1)	(@ 5 µL)		
H ₂ O	Hingga mencapai 20 µL		
	20 µL Final Volume		

(SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit)

Kondisi *Nested* PCR tahap pertama ditunjukkan pada Tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4
Kondisi *Nested* PCR Tahap 1

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus		
			I	II	III
Initial denaturation	95°C	3 min			
Denaturation	95°C	10 s			
Annealing	Grad (55°C, 60°C, 65°C)	10 s	35	20	30
Extension	72°C	20 s	35	20	30

(SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit)

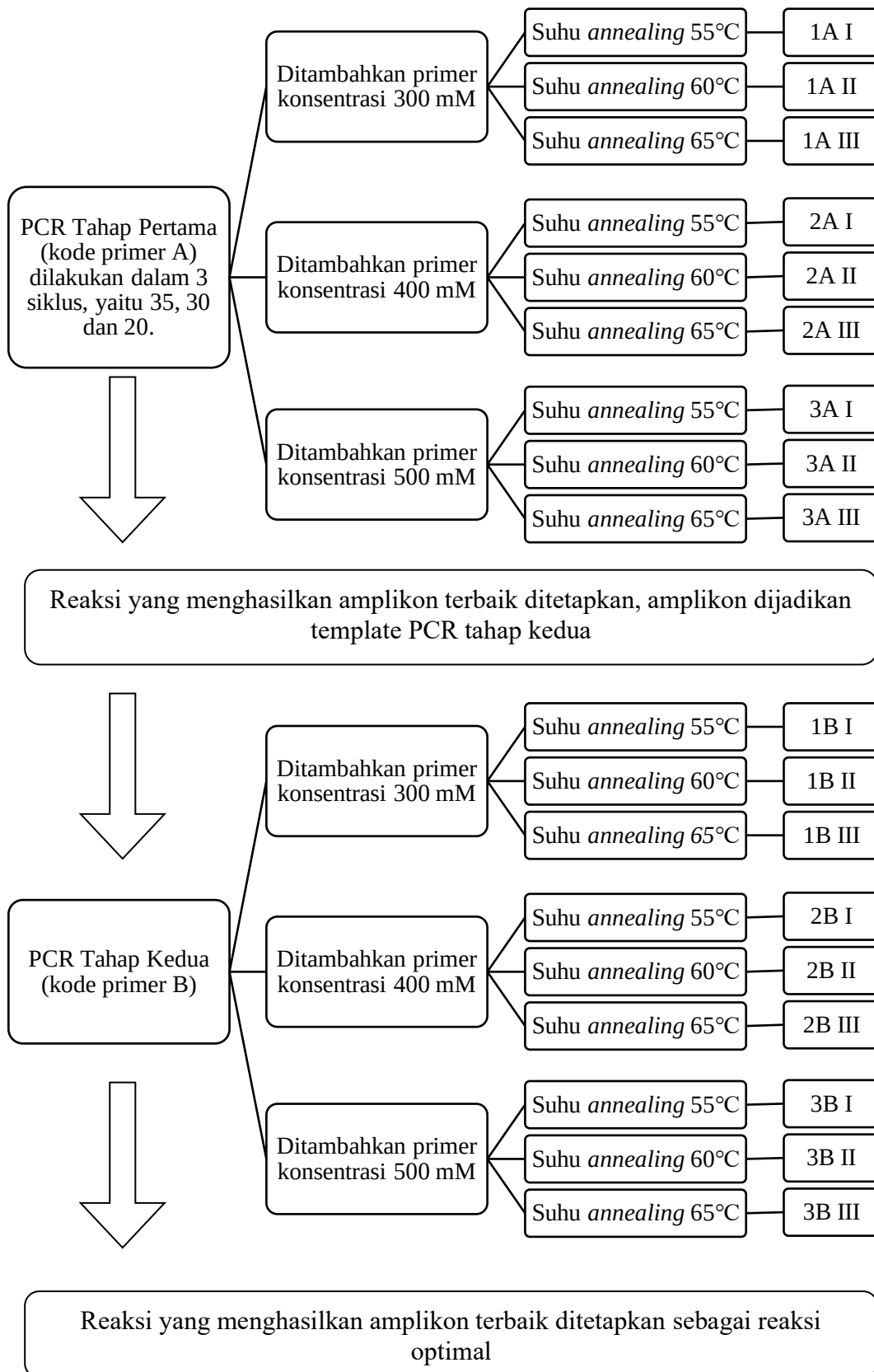
Kondisi *Nested* PCR tahap kedua ditunjukkan pada Tabel 5 di bawah ini

Tabel 5
Kondisi *Nested* PCR Tahap 2

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Initial denaturation	95°C	3 min	
Denaturation	95°C	10 s	
Annealing	Grad (55°C, 60°C, 65°C)	10 s	35
Extension	72°C	20 s	35

(SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit)

Skema optimasi reaksi beserta pengkodean sampel pada proses optimasi ditunjukkan pada Gambar 5 di bawah ini



Gambar 5 Skema Optimasi *Nested* PCR

Setelah didapatkan reaksi yang optimal, dilakukan pemeriksaan *Nested* PCR pada 12 sampel yang terdiri dari 10 sampel DNA terduga *E. coli* yang berasal dari sampel pangan, 1 NTC sebagai kontrol negatif, dan 1 sampel DNA *E. coli* ATCC sebagai kontrol positif.

i. Analisis hasil *Nested* PCR

Hasil *Nested* PCR dianalisis secara kualitatif dengan elektroforesis. Hasil amplifikasi dari proses PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% menggunakan alat elektroforesis. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan konstan 77 Volt selama 77 menit. Elektroforesis dihentikan kemudian gel diangkat untuk diamati dengan transluminator-UV. Penentuan sampel yang dinyatakan positif dilihat dari keberadaan pita gen dengan ukuran 305 bp. Hasil penelitian disajikan secara deskriptif (Aksono dkk., 2017).

5. Post analitik

Tahap post analitik meliputi analisis data hasil berupa data kualitatif dari pemeriksaan gel elektroforesis dan data kuantitatif dari pemeriksaan dengan alat nanodrop spektrofotometer.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data merupakan fakta maupun angka hasil pencatatan peneliti yang dapat menggambarkan keadaan dari objek penelitian (H. F. Nasution, 2016). Pada penelitian ini menggunakan data primer dan data sekunder.

a. Data primer

Data primer merupakan jenis data yang diperoleh secara langsung oleh peneliti selama proses pengambilan data (Pramiyati dkk., 2017). Data primer dalam penelitian ini yaitu desain primer *E. coli* dan pendaran untai DNA hasil amplifikasi.

b. Data sekunder

Data sekunder merupakan jenis data yang tidak diperoleh secara langsung selama proses penelitian oleh peneliti sendiri, melainkan data yang telah ada sebelumnya dan didapatkan melalui berbagai sumber (Pramiyati dkk., 2017). Data sekunder dalam penelitian ini yaitu sekuen bakteri *E. coli* yang didapatkan dari *GenBank* pada laman NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi, studi literatur, dan pemeriksaan laboratorium.

a. Observasi

Observasi merupakan metode pengumpulan data dengan cara mengamati atau meninjau secara cermat dan langsung di lokasi penelitian untuk mengetahui kondisi yang terjadi atau membuktikan kebenaran dari sebuah desain penelitian yang sedang dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan observasi terhadap hasil pemeriksaan laboratorium berupa pendaran pita DNA pada hasil *Nested* PCR yang diperiksa dengan UV-transluminator.

b. Studi literatur

Studi literatur dilakukan untuk mengumpulkan data berupa sekuen bakteri dan pembuatan desain primer.

c. Pemeriksaan laboratorium

Pemeriksaan laboratorium meliputi *Nested* PCR dengan optimasi untuk mendapatkan metode yang optimal dalam penggunaan desain primer sebagai deteksi bakteri *E. coli*.

3. Instrumen pengumpul data

Instrument utama dalam penelitian kualitatif yaitu peneliti sendiri untuk menganalisis, memaknai, serta mendeskripsikan hasil penelitian (Mahayana dkk., 2022). Adapun instrument tambahan dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Lembar observasi, merupakan instrument yang digunakan untuk mencatat hasil penelitian.
- b. Laptop, merupakan instrumen yang digunakan untuk mengumpulkan data pada metode *in silico*.
- c. *Handphone*, merupakan instrument yang digunakan untuk dokumentasi kegiatan penelitian.
- d. Peralatan laboratorium (UV-Transluminator dan Nanodrop Spektrofotometer), merupakan instrument untuk mendapatkan data hasil pemeriksaan.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Pengolahan data merupakan proses mengatur dan menyusun data agar siap untuk dianalisis. Pengolahan data meliputi tahap-tahap seperti *editing* (pemeriksaan data), *coding* (pemberian kode), *entry* (pemasukan data), dan tabulasi (penyajian data dalam tabel).

- a. *Editing* (pemeriksaan data) dilakukan untuk memastikan kebenaran data yang dikumpulkan dan kesesuaiannya dengan tujuan penelitian.
- b. *Coding* (pemberian kode) dilakukan untuk memberi tanda pada masing-masing hasil penelitian. Pada optimasi suhu *annealing*, setiap hasil amplifikasi dengan suhu yang berbeda diberikan tanda berupa kode.
- c. *Entry* (pemasukkan data) dilakukan dengan mengumpulkan lembar observasi dan pengumpulan dokumentasi penelitian.
- d. Tabulasi (penyajian data) berupa hasil amplifikasi DNA bakteri *E. coli* dengan desain primer yang didapatkan oleh peneliti dengan berbagai suhu *annealing* sebagai optimasi metode *Nested PCR*.

2. Analisa data

Data disajikan berupa tabel dan gambar. Data berupa karakteristik primer dianalisis menggunakan metode *in silico* dalam website NCBI, *primer3plus*, dan *benchling*, sedangkan data analisis hasil ekstraksi dan analisis hasil *Nested PCR* diolah secara manual kemudian dibahas secara deskriptif dalam bentuk narasi dengan kajian pustaka yang relevan.