

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Staphylococcus aureus*

1. Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut (Soedarto, 2015) diuraikan sebagai berikut:

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kingdom	: <i>Eubacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Staphylococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2. Morfologi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* berasal dari *staphyle* yang menggambarkan susunan seperti buah anggur, *coccus* yang menunjukkan bentuk bulat, dan *aureus* yang mengacu pada warna keemasan. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat dengan diameter 0,7-1,2 μm . Bakteri ini memiliki susunan sel yang tidak teratur, sering kali berbentuk seperti buah anggur. Selain itu, bakteri ini juga dapat tersusun dalam kelompok empat sel (tetrad), membentuk rantai pendek yang terdiri dari 3–4 sel, berpasangan, atau berdiri sendiri-sendiri. Bakteri ini tidak membentuk spora, bersifat fakultatif anaerob, dan tidak memiliki

kemampuan bergerak (*nonmotil*). (Karimela, Ijong dan Dien, 2017). Suhu optimal untuk pertumbuhan mikroorganisme ini adalah 37°C, tetapi pada suhu kamar sekitar 20°C hingga 25°C, mikroorganisme ini dapat menghasilkan pigmen *lipochrome*. Pigmen yang dihasilkan menunjukkan variasi warna mulai dari abu-abu, kuning keemasan, hingga kuning jingga. Koloni yang terbentuk memiliki bentuk bundar dengan permukaan yang halus, menonjol, dan tampak berkilau. Pigmen kuning yang dihasilkan menjadi perbedaan utama dengan *Staphylococcus epidermidis*, yang memproduksi pigmen putih (Dewi, 2013).

Pada karakteristik biokimianya *Staphylococcus sp.* bersifat katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung gas (O₂) yang diproduksi, hal inilah yang menjadi pembeda antara bakteri *Staphylococcus sp.* dengan *Streptococcus sp.* Bakteri ini mampu memfermentasikan karbohidrat, menghasilkan asam laktat serta memiliki kemampuan untuk memproduksi nuklease yang tahan panas serta menunjukkan hasil positif dalam uji DNase. *Staphylococcus aureus* memberikan hasil positif dalam pengujian koagulase. Dengan menggunakan faktor koagulase darah yang dimilikinya, bakteri ini mampu melindungi dirinya dari proses fagositosis dan respons imun tubuh inang dengan membentuk gumpalan fibrin dari fibrinogen yang terdapat dalam plasma. Pada tes voges-proskauer bakteri ini menunjukkan hasil positif dimana mampu menghasilkan asetoin atau asetil. Pada struktur selnya, dinding sel terluar bakteri *Staphylococcus aureus* terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa adanya lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida yang biasanya terkait dengan virulensi bakteri (Karimela, Ijong dan Dien, 2017).

3. Patogenitas *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri yang umum ditemukan di berbagai lingkungan, termasuk pada permukaan benda, pakaian, lantai, tanah, fasilitas kesehatan, serta di permukaan kulit manusia (Lestari dkk., 2019). Bakteri ini termasuk dalam kelompok bakteri gram positif yang bersifat patogen dan berperan sebagai penyebab utama berbagai penyakit pada manusia. Bakteri ini dapat ditemukan pada membran hidung dan permukaan kulit, sehingga berpotensi menyebabkan infeksi ringan seperti infeksi kulit dan keracunan makanan (Singkam dkk., 2024). Infeksi bakteri pada kulit dapat menimbulkan berbagai kondisi, seperti bisul, selulitis, impetigo, dan lain sebagainya (Hanina dkk., 2022). Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan penyakit yang mengancam kehidupan seperti sepsis, endocarditis (radang pada endocardium), osteomyelitis (abses pada tulang dan sumsum tulang), meningitis, infeksi paru-paru (pneumonia) dan *toxic shock syndrome* (Dewi dan Marniza, 2019)

Staphylococcus aureus menghasilkan berbagai produk akhir metabolisme, di mana beberapa di antaranya berperan dalam proses patogenitas. Produk metabolisme yang terkait dengan patogenitas meliputi koagulase, leukosidin, hemolisin, enterotoksin, dan toksin eksfoliatif. Koagulase berperan dalam pembentukan gumpalan darah, leukosidin dapat menghancurkan sel darah putih, hemolisin menyebabkan lisis pada sel darah merah, enterotoksin menjadi penyebab keracunan makanan, dan toksin eksfoliatif dapat memicu terjadinya sindrom kulit melepuh atau *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS)*. *Staphylococcus aureus* dan eksotoksin yang dihasilkan juga ditemukan dapat menyebabkan berbagai penyakit pada mamalia dan burung, seperti mastitis infeksius pada sapi,

dermatitis eksfoliatif pada babi, pioderma pada anjing, dan dermatitis/arthritis edematosa pada unggas (Zhu *et al.*, 2024).

B. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Untuk mengetahui keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus* perlu dilakukan identifikasi melalui pemeriksaan laboratorium, diantaranya sebagai berikut:

1. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram adalah metode pewarnaan bakteri yang menggunakan pewarna utama kristal violet berwarna biru keunguan dan pewarna kontras safranin berwarna merah. Teknik ini bertujuan untuk membedakan bakteri ke dalam dua kelompok, yaitu Gram positif dan Gram negatif, sesuai dengan variasi struktur dinding selnya, khususnya pada ketebalan lapisan peptidoglikan. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi morfologi sel *Staphylococcus aureus* dan mengevaluasi tingkat kemurnian kultur bakteri (Hayati *dkk.*, 2019). Prosedur pewarnaan Gram dimulai dengan melapisi spesimen menggunakan pewarna utama kristal violet. Setelah itu, spesimen dibilas dan diberikan pewarna kontras safranin. Mikroorganisme dengan dinding sel yang tebal dan kaya akan peptidoglikan akan mampu mempertahankan kristal violet selama proses pencucian, sehingga tampak berwarna ungu dan diklasifikasikan sebagai Gram positif. Sebaliknya, mikroorganisme dengan dinding sel yang tipis dan tidak mampu mempertahankan kristal violet akan kehilangan warna tersebut saat pencucian. Setelah pemberian safranin, mikroorganisme ini akan tampak berwarna merah dan dikategorikan sebagai Gram negatif (Dewi, 2013).

2. Kultur bakteri

Terdapat beberapa media yang dapat digunakan untuk membiakkan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada medium Tryptic Soy Agar (TSA), koloni *Staphylococcus aureus* tampak berwarna kuning karena mengandung pigmen *staphyloxanthin*, yang berperan sebagai faktor virulensi. Sementara itu, pada medium Mannitol Salt Agar (MSA), bakteri *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasi mannitol, yang menghasilkan asam dan menyebabkan penurunan pH pada medium. Penurunan pH ini memicu perubahan warna indikator fenol merah menjadi kuning, yang menandakan adanya aktivitas fermentasi mannitol. Selain itu, ketika *Staphylococcus aureus* dikultur pada medium Columbia Agar yang mengandung 5% darah domba defibrinasi dan diinkubasi pada suhu 37°C, bakteri ini menunjukkan zona hemolisis-beta yang luas di sekitar koloni (Soedarto, 2015).

3. Uji katalase

Uji katalase berfungsi untuk membedakan bakteri berbentuk coccus yaitu antara *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp* (Karimela, Ijong dan Dien, 2017). Pengujian katalase dilakukan dengan menempatkan bakteri *Staphylococcus aureus* pada larutan hidrogen peroksida 3% di atas *object glass*. Selanjutnya, diamati apakah terjadi pembentukan gelembung gas. Munculnya gelembung gas menunjukkan bahwa hasil uji katalase bersifat positif, yang menandakan bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase yang berfungsi menguraikan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Lestari dan Salasia, 2015).

4. Uji koagulase

Uji koagulase dilakukan dengan mengambil isolat bakteri menggunakan ose steril. Pada metode slide test, digunakan plasma sitrat untuk mengamati reaksi koagulasi. Hasil uji dikatakan positif apabila terbentuk gumpalan seperti gel pada preparat, yang menunjukkan adanya aktivitas enzim koagulase. Sebaliknya, jika tidak terbentuk gumpalan, hasil uji dinyatakan negatif (Widyastuti dan Nurdyansyah, 2017). Produksi koagulase merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan dalam proses identifikasi awal *Staphylococcus aureus*. Hasil reaksi koagulase yang positif memiliki peran penting dalam membedakan *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya (Dewi, 2013).

5. Uji gula manitol

Uji manitol bertujuan untuk membedakan apakah *Staphylococcus* tersebut bersifat patogen atau nonpatogen dengan menanamkan biakan bakteri ke media kultur, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Uji manitol dikatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium menjadi kuning, sedangkan hasil negatif ditandai dengan warna medium yang tetap merah (Hayati dkk., 2019).

6. Antibiotikogram/antibakteri

Uji sensitivitas antibiotik dilakukan untuk mengevaluasi efektivitas antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Proses pengujian ini melibatkan pengamatan terhadap pembentukan zona hambat di sekitar disk kertas yang telah diberi antibiotik. Jika terbentuk zona hambat, hal tersebut menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri yang diuji (Budiyanto, Satriawan dan Suryani, 2021).

7. Pemeriksaan molekuler

Salah satu pemeriksaan berbasis molekuler adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR adalah suatu metode *in vitro* dalam sintesis DNA dimana dalam prosesnya mencakup tahapan berulang yang menghasilkan penggandaan DNA target beruntai ganda (Amalia *dkk.*, 2020). Produk PCR yang dihasilkan akan dianalisis menggunakan teknik elektroforesis. Hasil dari elektroforesis ini diamati dengan membandingkan ketebalan pita (band) secara visual. Pita yang dianggap optimal adalah pita yang tampak tebal, tunggal (*single*), dan memiliki ukuran yang sesuai dengan target yang diharapkan. Metode PCR merupakan teknik yang dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi bakteri *Staphylococcus aureus* secara molekuler. Proses ini dilakukan dengan membandingkan ukuran DNA target dengan marker yang tersedia atau mencocokkan sekuens DNA target dengan sekuens referensi yang terdapat dalam bank gen (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

C. Isolasi DNA

1. Definisi isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari sel (ekstraksi atau lisis). Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan memisahkan DNA dari komponen seluler lainnya, seperti lipid, protein, polisakarida dan zat-zat lain yang tidak dibutuhkan. Proses ini penting dalam berbagai analisis molekuler dan aplikasi rekayasa genetika, seperti *genome editing*, transformasi dan reaksi rantai polimerase (PCR). Meskipun terdapat berbagai metode isolasi DNA, prinsip dasar yang diterapkan pada semua metode dan jenis sampel tetap sama, yaitu meliputi tahap lisis sel atau jaringan secara efektif, denaturasi kompleks nukleoprotein, serta inaktivasi enzim nuklease untuk mencegah degradasi DNA (Hariyadi, Narulita dan Rais, 2018).

Proses lisis merupakan tahap awal yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan isolasi DNA. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dalam tahap ini, di antaranya metode kimia dengan penggunaan enzim seperti proteinase-K dan deterjen SDS untuk memecah membran sel. Selain itu, lisis juga dapat dilakukan secara mekanik, misalnya dengan penggerusan menggunakan nitrogen cair atau melalui inkubasi dengan perlakuan suhu tertentu untuk memfasilitasi pelepasan DNA dari sel (Hariyadi, Narulita dan Rais, 2018).

Isolasi DNA merupakan proses untuk mendapatkan DNA murni dari suatu sel dalam jaringan, dengan menghilangkan kandungan protein dan RNA yang mungkin masih terdapat di dalamnya. Keberhasilan isolasi DNA dapat dievaluasi melalui beberapa metode, seperti pemeriksaan adanya pita DNA menggunakan teknik elektroforesis gel atau dengan mengukur konsentrasi DNA yang terlarut menggunakan metode spektrofotometri.

2. Tahapan isolasi DNA

Terdapat berbagai metode untuk memurnikan atau melakukan purifikasi DNA dari komponen lain, terutama protein. Meskipun terdapat variasi dalam teknik yang digunakan, semua metode tersebut tetap berpegang pada prinsip dasar yang sama, yaitu:

a. *Lisis* (menghancurkan dinding sel)

Menghancurkan sel merupakan proses memecahkan atau melisis sel untuk melepaskan isi sel, termasuk DNA. Proses penghancuran atau pemecahan sel dapat dilakukan dengan teknik fisika, seperti sonikasi, penggilingan, pencacahan, atau pemberian tekanan tinggi agar sel dapat terdisintegrasi. Namun, metode ini sering menyebabkan DNA terfragmentasi, sehingga tingkat kemurniannya menurun.

Oleh karena itu, metode yang lebih disarankan adalah menggunakan bahan kimia, seperti penambahan deterjen atau metode enzimatik. Deterjen anionik seperti SDS (Sodium Dodesil Sulfat) atau sarkosil (Sodium Dodesil Sarkosinat) sering digunakan karena lebih efektif dalam mengganggu membran sel tanpa merusak DNA secara signifikan (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

b. *Deproteinasi* (menghilangkan protein)

Pemurnian DNA merupakan proses untuk menghilangkan semua komponen protein dalam sampel, yang dikenal sebagai deproteinasi. Proses ini bekerja dengan mengurangi kelarutan protein, sehingga protein akan mengendap sementara asam nukleat tetap larut dalam larutan. Terdapat berbagai metode yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein, seperti penggunaan fenol-kloroform, enzim protease, enzim proteinase K serta penambahan asam cuka (Puspitaningrum *dkk.*, 2018).

c. Pembuangan RNA

Untuk menghilangkan RNA selama proses isolasi DNA, digunakan metode enzimatik. Namun, tidak semua RNA dapat dihilangkan sepenuhnya, sehingga masih ada sedikit RNA yang tersisa dalam hasil pemurnian DNA. Enzim yang digunakan dalam proses ini terdiri dari RNase A dan RNase T1, di mana mekanisme kerjanya didasarkan pada pemutusan rantai RNA pada basa nukleotida urasil, sitosin, dan guanin (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

d. Presipitasi (pengendapan DNA)

Proses pengendapan dan pemekatan DNA dilakukan saat tahap deproteinisasi dengan menggunakan campuran fenol-kloroform-alkohol. Prinsip utama pengendapan DNA dalam alkohol didasarkan pada turunnya kelarutan asam

nukleat dalam air. Molekul air yang bersifat polar akan mengelilingi DNA dan memengaruhi kelarutannya. Ketika etanol ditambahkan, potensial ion DNA akan berubah, menyebabkan pelepasan molekul air yang berinteraksi dengan DNA. Akibatnya, DNA akan mengalami pengendapan (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

3. Metode isolasi DNA

a. Berbasis Kit

Isolasi DNA berbasis kit merupakan teknik isolasi menggunakan satu paket kit terdapat larutan isolasi yang siap pakai untuk pemisahan sel tanaman, hewan, manusia, maupun bakteri (Octavia *dkk.*, 2021). Proses isolasi DNA menggunakan kit pemurnian dianggap lebih cepat, sederhana dan efisien dibandingkan metode isolasi konvensional. DNA yang dihasilkan dari pemurnian dengan kit memiliki kualitas yang lebih baik, sehingga dapat digunakan secara optimal sebagai template dalam berbagai aplikasi laboratorium, seperti pencernaan enzim restriksi, analisis PCR, sekuensing, penyimpanan di Gen Bank, isolasi DNA genom, proses ligasi DNA, serta prosedur transformasi genetik (Universal DNA Purification Kit Handbook, 2021). Namun, isolasi DNA berbasis kit juga memiliki beberapa kekurangan diantaranya memiliki biaya yang relatif tinggi serta memerlukan peralatan tambahan untuk memastikan akurasi dalam tahap pemurnian DNA, seperti pipet mikro, filter dan sentrifuge. Sehingga proses pemurnian DNA saat ini masih belum dapat dilakukan di sembarang laboratorium (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

b. Kimiawi

Isolasi DNA dapat menggunakan teknik kimiawi dimana dalam prosesnya menggunakan penambahan bahan-bahan kimia yang dapat merusak membrane sel dan membrane inti seperti SDS (Sodium Deodesil Sulfat), sarkosil (sodium deodesil sarkosinat), CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) serta fenol-kloroform (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

c. Fisika

Isolasi DNA dapat menggunakan teknik fisika untuk memisahkan DNA dari sel seperti dengan sonikasi, grinding/ giling, pembekuan, cacah atau dengan tekanan tinggi agar sel hancur. Namun, hal ini sering menyebabkan DNA terfragmentasi sehingga kemurnian DNA akan turun (Puspitaningrum, Adhiyanto dan Solihin, 2018).

D. Metode Perebusan dalam Isolasi DNA

1. Metode perebusan

Metode perebusan adalah teknik sederhana untuk mengisolasi DNA dengan cara memanaskan sel bakteri pada suhu tinggi (95-100°C), sehingga menyebabkan kerusakan pada struktur sel. Pemanasan pada suhu tinggi dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding sel, yang memungkinkan cairan dan molekul di sekitar sel lebih mudah masuk ke dalam sel, sementara materi dari dalam sel keluar. Selain itu, suhu tinggi juga berperan dalam menginaktivasi enzim, seperti DN-ase, yang berpotensi merusak DNA (Muna *dkk.*, 2014).

Suhu dan durasi pemanasan perlu disesuaikan dengan jenis sampel yang akan dianalisis. Pemanasan pada suhu yang terlalu tinggi atau dalam durasi yang terlalu lama dapat berpotensi merusak DNA target dan memperlambat proses isolasi.

Metode isolasi DNA dengan teknik perebusan cukup sederhana, karena hanya memerlukan waktu beberapa menit dan biaya yang relatif terjangkau (Muna *dkk.*, 2014).

2. Presipitasi etanol

Presipitasi yakni mengendapkan kandungan DNA yang selanjutnya dilakukan pemurnian sampel DNA dengan meminimalkan kehilangan produk DNA selama proses berlangsung (Lever *dkk.* 2015). Dengan pengendapan tersebut, ikatan antara DNA dengan protein histon akan hilang serta menyebabkan untai-untai DNA yang tidak lagi menggulung (*coiling*) sehingga pada akhirnya DNA menjadi terlihat (Utami, Kusharyati dan Pramono, 2013). Presipitasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara salah satunya dengan larutan etanol.

Presipitasi etanol merupakan teknik yang umum digunakan untuk memekatkan dan menghilangkan garam pada sediaan asam nukleat (DNA atau RNA) dalam larutan berair. Penambahan etanol dingin dapat menurunkan kelarutan DNA, sehingga DNA akan mengendap. Sementara itu, protein dan lemak akan berada di dalam larutan etanol (Purwoko, 2018). Etanol memiliki dielektrik lebih rendah daripada air sehingga memudahkan garam yang memiliki muatan positif (Na^+) untuk berinteraksi dengan DNA yang bermuatan negatif. Interaksi tersebut menyebabkan DNA bersifat hidrofob dan mengendap (Murtiyaningsih, 2017).

3. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Teknik aplikasi molekuler menghadirkan parameter baru yang lebih cepat dalam klasifikasi bakteri, yaitu melalui analisis sekuens gen 16S rRNA. Analisis ini memungkinkan identifikasi bakteri secara akurat berdasarkan perbedaan pada sekuens genetik yang spesifik. Molekul gen 16S rRNA memiliki urutan basa yang

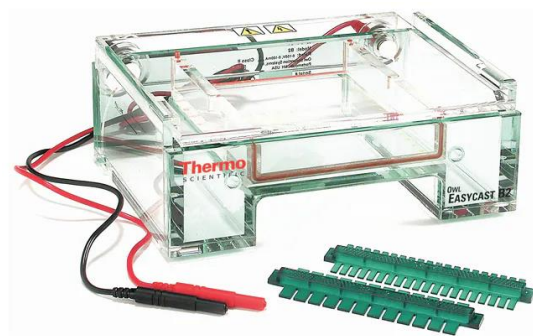
terdiri dari daerah yang dilestarikan (*konservatif*) dan beberapa daerah *variable* dengan panjang urutan gen sekitar 500-1.550 bp (*base pair*). Identifikasi bakteri menggunakan 16S rRNA memiliki beberapa keuntungan, antara lain: (1) mampu mengidentifikasi bakteri langka dan bakteri dengan karakteristik fenotipik yang tidak umum, (2) dapat mengenali bakteri dengan laju pertumbuhan yang lambat, seperti *Mycobacterium*, yang biasanya membutuhkan waktu 6-8 minggu untuk tumbuh dalam media kultur, (3) menawarkan akurasi dan efisiensi yang tinggi dengan waktu identifikasi yang lebih singkat dibandingkan metode konvensional, (4) berpotensi membantu dalam penemuan spesies dan genus bakteri baru, serta (5) mampu mendeteksi bakteri yang sulit atau bahkan tidak dapat dikultur, sehingga mempermudah diagnosis infeksi yang disebabkan oleh bakteri tersebut (Noer, 2021).

Identifikasi bakteri secara molekuler dapat dilakukan dengan mengisolasi DNA kromosom bakteri, kemudian mengidentifikasi gen yang mengkode rRNA, yaitu gen 16S rRNA. Proses identifikasi sekuens gen 16S rRNA ini dilakukan dengan metode PCR sehingga dapat dianalisis lebih lanjut. PCR adalah metode yang digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA dalam waktu singkat melalui proses berulang. Pada teknik PCR untuk amplifikasi gen 16S rRNA, terdapat tiga tahapan utama yang meliputi denaturasi, annealing, dan ekstensi. Denaturasi bertujuan memisahkan rantai ganda DNA, annealing memungkinkan primer menempel pada urutan target, dan ekstensi berperan dalam sintesis untai DNA baru (Hariyadi, Narulita dan Rais, 2018).

Pada tahap denaturasi, untai ganda DNA template dipisahkan menjadi untai dua untai tunggal. Selanjutnya, masing-masing untai tunggal ini akan ditemplei

oleh primer. Terdapat dua jenis primer yang digunakan, yaitu primer maju (*forward primer*) dan primer mundur (*reverse primer*). Setelah primer menempel pada untai DNA template, proses polimerisasi akan berlangsung dari titik penempelan primer hingga mencapai ujung 5' DNA template. Hasil dari siklus pertama reaksi ini adalah terbentuknya dua pasang untai DNA, dengan asumsi bahwa DNA template awal terdiri dari satu pasang untai tunggal DNA (Utami, Kusharyati dan Pramono, 2013).

4. Elektroforesis



Gambar 1. Multi Gel Electrophoresis System

Sumber: (Thermo Scientific, 2025)

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan sifat kelistrikan zat tersebut, khususnya pada ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekul. Salah satu jenis gel yang sering digunakan dalam teknik ini adalah gel agarosa. Gel agarosa memungkinkan pemisahan fragmen DNA dengan ukuran mulai dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp). Karena DNA bermuatan negatif, maka ketika diberikan medan listrik, molekul DNA akan bergerak melalui matriks gel menuju kutub positif (*anode*). Semakin besar ukuran fragmen DNA, semakin lambat lajunya dalam gel. Fragmen DNA dapat diperkirakan berat molekulnya dengan mengamati laju migrasi dibandingkan

dengan DNA marker yang memiliki ukuran pasti (Utami, Kusharyati dan Pramono, 2013).

Marker adalah segmen DNA dengan ukuran yang sudah diketahui dan spesifik. Marker digunakan untuk menentukan ukuran fragmen DNA dari hasil amplifikasi. Dalam elektroforesis, marker DNA berfungsi sebagai penanda posisi molekul DNA yang bermigrasi, sehingga memungkinkan perkiraan ukuran fragmen DNA berdasarkan pola migrasinya. Fragmen DNA yang berada paling dekat dengan sumuran memiliki berat molekul terbesar, sedangkan fragmen DNA marker yang bermigrasi paling jauh dari sumuran menunjukkan fragmen dengan berat molekul atau ukuran yang paling kecil (Utami, Kusharyati dan Pramono, 2013).

Pergerakan DNA dalam elektroforesis dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

a. Ukuran molekul DNA

Fragmen DNA yang lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat melalui gel karena memiliki lebih sedikit hambatan dibandingkan dengan fragmen yang lebih besar.

b. Konsentrasi gel amplifikasi

Semakin tinggi konsentrasi agarosa dalam gel, semakin sulit bagi molekul DNA untuk melewati gel. Gel dengan konsentrasi tinggi lebih efektif untuk memisahkan fragmen DNA kecil, sedangkan gel dengan konsentrasi rendah lebih cocok untuk memisahkan fragmen DNA yang lebih besar.

c. Bentuk molekul

Struktur DNA juga memengaruhi kecepatannya dalam gel. Molekul DNA berbentuk *supercoil* atau *elips* akan bergerak lebih cepat dibandingkan molekul DNA berbentuk *linier*.

d. Densitas muatan

Molekul DNA dengan densitas muatan yang lebih tinggi akan bergerak lebih cepat dibandingkan molekul dengan densitas muatan yang lebih rendah. Densitas ini ditentukan oleh jumlah muatan per unit volume molekul.

e. Voltase

Voltase yang lebih tinggi akan mempercepat pergerakan DNA dalam gel karena medan listrik yang lebih kuat menarik molekul DNA lebih cepat ke arah anode.

f. Larutan buffer

Larutan buffer dengan kadar ion yang tinggi akan meningkatkan konduktivitas listrik, sehingga mempercepat migrasi DNA dalam medan listrik.

5. Spektrofotometer nanodrop



Gambar 2. Microvolume Spectrophotometer Nanodrop One

Sumber: (e-katalog LKPP, 2022)

Spektrofotometri merupakan metode yang umum digunakan dalam analisis laboratorium untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA. Prinsip kerja teknik ini didasarkan pada kemampuan DNA dalam menyerap cahaya dari sumber cahaya tertentu, sehingga memungkinkan untuk menilai kualitas sampel secara kuantitatif. Molekul DNA menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang

gelombang 260 nm (A260), sedangkan absorbansi pada 280 nm (A280) digunakan untuk mengukur kandungan protein dan fenol. Perbandingan nilai absorbansi A260/A280, A260/A230, dan A260/A325 digunakan untuk menilai kemurnian DNA serta mendeteksi adanya kontaminan seperti protein dan fenol dalam sampel biologis selama proses ekstraksi DNA. Kemurnian template DNA sangat penting agar bebas dari kontaminasi protein, polisakarida, maupun RNA (Kusumawati *dkk.*, 2023)

Pengukuran jumlah total DNA hasil isolasi merupakan langkah rutin yang biasanya dilakukan di laboratorium penelitian dan pengujian biologi sebelum melanjutkan ke tahap analisis berikutnya, seperti penerapan teknik PCR. Dalam proses ini, isolat DNA harus memiliki tingkat kemurnian yang tinggi (bebas dari kontaminan) serta integritas yang baik (tidak mengalami degradasi), karena keduanya merupakan aspek krusial dalam analisis berbasis DNA. Nilai kemurnian yang rendah menunjukkan bahwa proses ekstraksi DNA belum optimal, sehingga masih terdapat kontaminan seperti protein dan DNA genom yang terbawa. Ketidakmurnian serta rendahnya konsentrasi DNA dalam isolat dapat menghambat penelitian, menyebabkan hasil yang bervariasi, serta menghasilkan nilai kuantifikasi yang tidak akurat (Kusumawati *dkk.*, 2023).