

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan hasil kultur bakteri yang resisten terhadap kloramfenikol yang didapat dari darah pasien dengan diagnosis demam tifoid di Puskesmas Bendosari, Sukoharjo. Sampel kemudian dikultur dan diuji pada media selektif untuk *Salmonella sp.*, *Bismuth Sulfide Agar* (BSA). Koloni yang tumbuh di BSA kemudian diuji resistensi menggunakan metode *disc diffusion* lalu dibiakkan pada media penyubur. Sampel bakteri yang tumbuh pada media penyubur kemudian dilakukan ekstraksi DNA. Hasil dari ekstraksi DNA kemudian diperiksa secara molekuler menggunakan alat miniPCR dengan menggunakan variasi suhu dan siklus yang sudah ditentukan. Produk PCR yang diperoleh kemudian dielektroforesis dan divisualisasikan menggunakan alat UV *transilluminator*.

### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Bulan Mei - Juni 2024 di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Setia Budi Surakarta.

### **C. Sampel**

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* yang diisolasi dari darah pasien yang didiagnosis demam tifoid. Bakteri

tersebut divalidasi resisten terhadap antibiotik kloramfenikol melalui uji resistensi antibiotik metode *disc diffusion*. Uji mikrobiologi ini dilakukan pada penelitian yang lain karena penelitian ini merupakan penelitian lanjutan.

#### **D. Definisi Operasional**

1. Desain primer adalah perancangan untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk proses reaksi berantai polimerase.
2. Suhu *annealing* adalah suhu yang digunakan pada tahap *annealing* pada proses PCR. Suhu yang digunakan pada tahap *annealing* tergantung pada *melting temperature* ( $T_m$ ) dari primer
3. Siklus adalah keseluruhan tahap pada proses PCR. Satu siklus terdiri dari tahap denaturasi, *annealing*, dan *extension*.
4. Proses isolasi DNA adalah proses pemurnian DNA dari sampel yang diperiksa.
5. *Band* atau pita DNA adalah hasil visualisasi dari produk PCR berupa pita tunggal, tebal, dan tanpa *smear*.

#### **E. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Alat
  - a. Alat untuk isolasi DNA, antara lain:
    - 1) Mikropipet

- 2) *Yellow tip*
- 3) *Blue tip*
- 4) *Microtube 1,5 mL*
- 5) *Collection tube 2 mL*
- 6) *FATG Mini Column*
- 7) *Rak*
- 8) *Drybath*
- 9) *Falcon*
- 10) *Centrifuge*

b. Alat untuk PCR, antara lain:

- 1) *Thermal cyclers (miniPCR)*
- 2) *PCR tube*

c. Alat untuk pembuatan *gel agarose*, antara lain:

- 1) *Cetakan gel agarose + sisir*
- 2) *Neraca digital*
- 3) *Microwave*
- 4) *Tabung erlenmeyer*
- 5) *Sendok*
- 6) *Kertas*

d. Alat untuk elektroforesis, antara lain:

- 1) *Bluegel elektroforesis*
- 2) *Mikropipet*

2. Bahan

- a. Bahan untuk isolasi DNA, antara lain:
  - 1) Darah
  - 2) Kit Isolasi DNA *Favorgen*
  - 3) Ethanol
- b. Bahan untuk PCR, antara lain:
  - 1) PowerPol 2X PCR Mix *with Dye*
  - 2) DNA *template*
  - 3) *Nuclease Free Water*
  - 4) Primer 1 *Forward* (TTCTTGCCCGCCTGATGAAT)
  - 5) Primer 1 *Reverse* (ACCGTAACACGCCACATCTT)
  - 6) Primer 2 *Forward* (CCGTTGATATATCCCAATGG)
  - 7) Primer 2 *Reverse* (CTGGTGAAACTCACCCAGGG)
- c. Bahan untuk pembuatan *gel agarose*:
  - 1) Serbuk *agarose*
  - 2) TBE Buffer
  - 3) *Gel Green*
- d. Bahan untuk elektroforesis:
  - 1) DNA *Ladder*
  - 2) TBE Buffer

## **F. Prosedur Penelitian**

### 1. Desain primer

- a. Desain primer diawali dengan pencarian data sekuens nukleotida gen cat dari bakteri *Salmonella typhi* menggunakan penelusuran pada menu khusus di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dengan kata kunci yaitu “*Salmonella typhi, chloramphenicol acetyl transferase*”.
- b. Dipilih item yang sesuai dengan bakteri yang kita gunakan, lalu dipilih “*Pick Primers*”.
- c. Kemudian dilakukan penyesuaian suhu dengan mengganti suhu di setiap *pick primer* yang dilakukan, lalu dipilih primer yang sesuai kriteria primer yang baik.

2. Prosedur isolasi DNA menggunakan kit *Favorgen*:

- a. Bakteri *S. typhi* resisten dan sensitif kloramfenikol yang sudah dikultur di media penyubur *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian diekstraksi untuk dimurnikan DNA-nya.
- b. Kultur bakteri diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube*.
- c. Sampel di-*centrifuge* pada kecepatan penuh (4.500 rpm) selama 2 menit dan supernatan dibuang.
- d. Ditambahkan 200  $\mu$ L FATG1 Buffer kemudian dicampur dengan pipet.
- e. Ditambahkan 20  $\mu$ L Proteinase K ke dalam campuran sampel, kemudian dicampur dengan vortex.
- f. Sampel diinkubasi pada 60°C sampai jaringan terlisiskan seluruhnya (1~3 jam).

- g. Ditambahkan 200  $\mu$ L FATG2 Buffer ke dalam campuran sampel, dicampur secara kuat menggunakan vortex dan diinkubasi pada 70°C selama 10 menit.
- h. Ditambahkan 200  $\mu$ L ethanol (96% - 100%) ke campuran sampel. Dicampur secara kuat dengan vortex.
- i. Tube di-*centrifuge* sebentar untuk menghilangkan tetesan yang menempel di tutup.
- j. FATG *Mini Column* dipasang di *Collection Tube*. Semua campuran di atas dipindahkan secara hati – hati ke dalam FATG *Mini Column*. Di-*centrifuge* pada kecepatan penuh selama 1 menit kemudian FATG *Mini Column* dipindahkan ke *Collection Tube* yang baru.
- k. Ditambahkan 400  $\mu$ L W1 Buffer ke FATG *Mini Column*. Di-*centrifuge* pada kecepatan penuh selama 1 menit kemudian cairan yang mengalir di bawah dibuang.
- l. Ditambahkan 750  $\mu$ L *Wash Buffer* ke FATG *Mini Column*. Di-*centrifuge* pada kecepatan penuh selama 1 menit kemudian cairan yang mengalir di bawah dibuang.
- m. Di- *centrifuge* kembali selama 3 menit dengan kecepatan penuh untuk mengeringkan *Column*.
- n. Ditambahkan 100  $\mu$ L *Elution Buffer* yang sebelumnya sudah dipanaskan ke dalam membran FATG *Mini Column*.
- o. FATG *Mini Column* diberdirikan selama 3 menit.

- p. Di-*centrifuge* pada kecepatan penuh selama 2 menit untuk melulusi DNA.

3. Prosedur pembuatan *gel agarose* 1% adalah sebagai berikut:

- a. Serbuk *agarose* ditimbang sebanyak 0,2 gram lalu dituangkan dalam tabung erlenmeyer.
- b. Ditambahkan TBE Buffer 1X sebanyak 20 mL ke dalam tabung erlenmeyer.
- c. Campuran serbuk *agarose* dan TBE Buffer dipanaskan menggunakan *microwave* selama  $\pm$  30 detik atau sampai serbuk larut tetapi tidak sampai mendidih.
- d. Cetakan *gel agarose* disiapkan dan dipasang sisir di salah satu ujungnya.
- e. Jika suhu sudah turun hingga sekitar 50 - 60°C, larutan dihomogenkan lalu ditambah 1  $\mu$ L *Gel Green* dan dihomogenkan kembali.
- f. Larutan dituang perlahan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak ada gelembung udara di dalamnya.
- g. *Agarose* ditunggu hingga mengeras lalu sisir diambil.
- h. *Gel agarose* 1% siap digunakan.

4. Prosedur PCR

- a. Sampel disiapkan terlebih dahulu dengan mencampurkan bahan – bahan berikut:

- 1) 12,5  $\mu$ L PowerPol 2X PCR Mix *with Dye*
  - 2) 0,5  $\mu$ L Primer Forward
  - 3) 0,5  $\mu$ L Primer Reverse
  - 4) 7,5  $\mu$ L DNA Template
  - 5) 4  $\mu$ L *Nuclease Free Water*
- b. Campuran sampel kemudian diamplifikasi menggunakan alat miniPCR sebanyak 30 siklus dengan kondisi berikut:
- 1) Dilakukan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit.
  - 2) Denaturasi selama 1,5 menit dengan suhu 94°C
  - 3) *Annealing* selama 1 menit dengan suhu 57°C
  - 4) *Extension* selama 1 menit dengan suhu 72°C
  - 5) Pada akhir siklus dilakukan perpanjangan tambahan selama 5 menit pada suhu 72°C.
  - 6) Tahap 1) sampai 5) diulangi kembali dengan menggunakan variasi suhu *annealing* 60°C dan 63°C sebanyak 40 siklus.
5. Prosedur Elektroforesis adalah sebagai berikut:
- a. *Gel agarose* 1% dimasukkan ke dalam aparatus elektroforesis.
  - b. TBE Buffer dituangkan ke dalam aparatus elektroforesis hingga *gel agarose* terendam.
  - c. DNA *Ladder* diambil 3  $\mu$ L lalu dimasukkan dalam sumuran pertama, dilanjutkan sampel pada sumuran berikutnya dengan volume yang sama dan dicatat posisi serta urutan sampel.



- d. Aparatus elektroforesis ditutup dengan penutup berwarna gelap.
- e. Alat dinyalakan dengan menekan tombol Power dan Blue Light dinyalakan untuk mempermudah pengamatan.
- f. Setelah selesai, hasil difoto dan alat dimatikan.

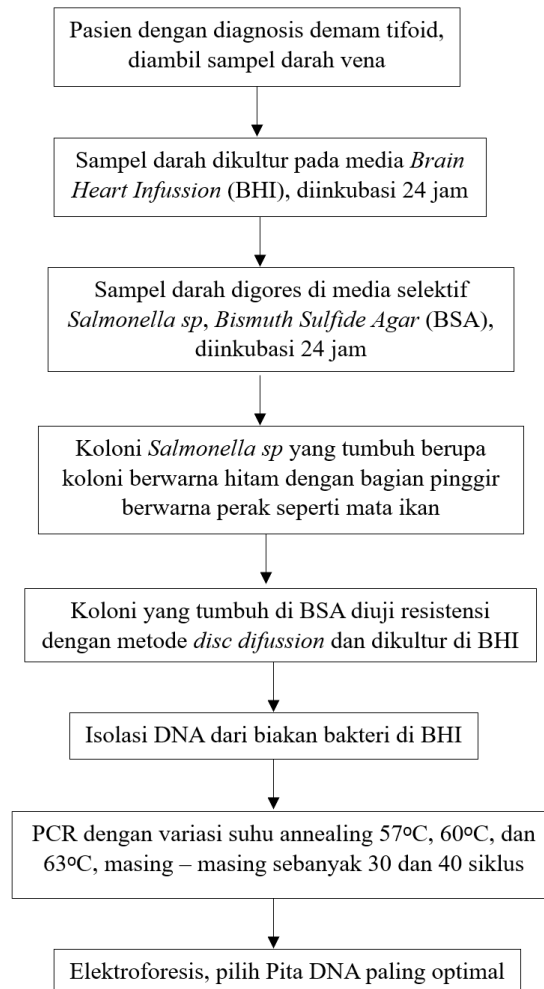
#### **G. Teknik Pengumpulan Data**

Data berupa gambaran pita DNA dari hasil PCR dengan variasi suhu dan siklus yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis.

#### **H. Teknik Analisis Data**

Data dianalisis dengan melakukan perbandingan intensitas pita DNA dari berbagai variasi suhu dan siklus, dipilih pita yang paling optimal.

## I. Alur Penelitian



**Gambar 7. Alur Penelitian**