

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun pertengahan 1990 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mulai diperkenalkan dan digunakan sebagai salah satu metode untuk diagnosis penyakit infeksi. PCR merupakan suatu teknik deteksi dengan memanfaatkan amplifikasi DNA atau gen target pada organisme asing yang terdapat dalam penyintas infeksi tertentu. Saat ini, salah satu penyakit infeksi yang dapat memanfaatkan metode PCR adalah deteksi cemaran *Escherichia coli* (*E.coli*) pada pasien yang diare atau keracunan makanan. Selama ini, deteksi *E.coli* banyak digunakan metode kultur ke dalam media. Metode ini dapat mendeteksi wujud bakteri yang berbentuk batang, bersifat Gram-negatif, fakultatif anaerob, dan tidak membentuk spora. Umumnya bakteri ini dapat ditemukan dalam usus hewan maupun manusia (Kurniati dkk, 2019).

Proses PCR dimulai dari isolasi asam nukleat dari matriks sampel yang bertujuan untuk memperoleh DNA target dengan kemurnian yang tinggi. Proses selanjutnya adalah amplifikasi, proses ini melibatkan siklus berulang dimulai dengan tahap denaturasi yaitu pemanasan untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Tahap kedua adalah *annealing* yaitu tahap penempelan pasangan primer pada untai DNA target, diikuti dengan tahap *extension* yaitu tahap pemanjangan untuk membentuk sekuens DNA baru dengan penambahan enzim, buffer, dNTPs, dan primer. Setelah proses amplifikasi, pada PCR konvensional fragmen DNA dapat diidentifikasi berdasarkan ukurannya melalui metode elektroforesis gel agarosa (Yuwono, 2016).

Elektroforesis gel agarosa merupakan suatu teknik yang sering digunakan dalam berbagai bidang ilmu untuk memisahkan suatu campuran DNA pada substrat agarosa. Metode ini digunakan khususnya untuk melakukan analisis kualitatif terhadap sampel DNA. Dengan menggunakan marker yang sesuai, dapat dievaluasi integritas DNA serta mengukur ukuran fragmen DNA yang beragam dalam bentuk pasang basa (*base pair*).

Metode elektroforesis membutuhkan media pemisah berupa fase diam seperti gel agarosa yang tercampur dengan larutan *TAE buffer* yang dapat menjaga kondisi pH saat proses pemisahan tetap terjaga dengan baik. Gel agarosa dapat digunakan untuk memisahkan DNA yang berukuran lebih dari 100 bp. Molekul sampel akan bergerak dalam matriks gel ke arah kutub listrik yang sesuai dengan muatannya, seperti DNA dan RNA yang akan bergerak menuju elektroda positif. Pada elektroforesis terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi pergerakan molekul DNA, yaitu ukuran molekul DNA, konsentrasi gel, bentuk molekul, jumlah muatan atau densitas muatan, pori-pori gel, larutan *buffer*, dan voltase. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya pita (*band*) yang diperoleh dari DNA hasil amplifikasi (amplikon) yang telah bermigrasi dan diwarnai dengan pewarna tertentu seperti Etidium Bromida (EtBr).

Dalam beberapa penelitian, diketahui bahwa proses elektroforesis juga dapat terpengaruh oleh durasi perendaman gel agarosa, yang dapat berdampak pada hasilnya karena berkaitan dengan laju reaksi. Durasi waktu pada tahap elektroforesis juga dapat memengaruhi efektivitas hasil elektroforesis dan laju migrasinya (elektromobilitas). Ketika waktu proses elektroforesis singkat, fragmen-fragmen DNA yang berukuran

besar masih cenderung saling melekat. Oleh karena itu, perlu keseimbangan antara tegangan listrik dan durasi waktu yang diberikan untuk mendapatkan hasil pita DNA yang baik.

Menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Putri dkk (2023) mengenai proses elektroforesis dengan menggunakan sampel DNA marker yang dilakukan pada tegangan listrik 50 volt selama 30 menit mendapatkan hasil fragmen DNA yang tipis hingga samar-samar dan memiliki *smear*. Lalu dari hasil penelitian Halimah (2023) telah mendapatkan hasil optimum mengenai voltase dan waktu pada proses elektroforesis untuk pemeriksaan *Mycobacterium Tuberculosis* yaitu pada voltase 100 volt dengan Waktu 30 menit. Pada voltase 150 volt belum terdapat penelitian sebelumnya, maka peneliti tertarik untuk meneliti lebih lanjut dengan menggunakan voltase tersebut.

Dari hasil penelitian yang sebelumnya sudah mengetahui voltase dan Waktu yang optimum terhadap kualitas pita DNA *Mycobacterium tuberculosis*, maka peneliti tertarik untuk meneliti lebih lanjut mengenai Optimasi Variasi Voltase dan Waktu terhadap kualitas Pita DNA *Escherichia Coli* pada Proses Elektroforesis Gel Agarosa. Hal itu dikarenakan belum adanya penelitian yang membahas hasil pita-pita DNA pada voltase dan waktu yang berbeda dengan DNA target *16SrRNA Escherichia coli*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah voltase yang optimum terhadap hasil pita DNA *E.coli* pada proses Elektroforesis?
2. Berapakah waktu yang optimum terhadap hasil pita DNA *E.coli* pada proses Elektroforesis?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui voltase yang optimum terhadap hasil pita DNA *E.coli* pada proses Elektroforesis
2. Untuk mengetahui waktu yang optimum terhadap hasil pita DNA *E.coli* pada proses Elektroforesis

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Sebagai bahan informasi dalam memberikan pemahaman yang lebih dalam tentang bagaimana variasi voltase dan waktu pada proses elektroforesis.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat memberikan informasi dan bahan pertimbangan dalam menghasilkan pita DNA yang baik dalam proses elektroforesis
2. Dapat membantu ATLM meningkatkan kualitas analisis dengan mengurangi tegangan listrik dan menentukan waktu yang baik untuk menghasilkan pita DNA yang baik