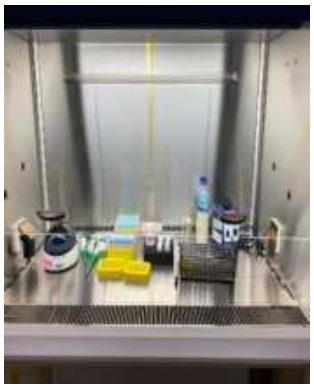
L A M P I R A N

Lampiran 1

Sterilisasi Tabung

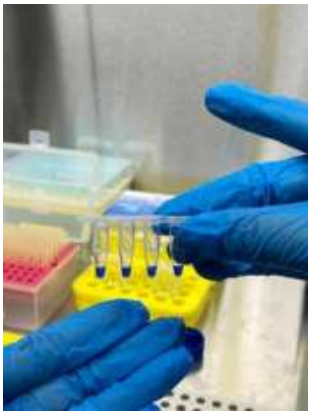
Inokulasi bakteri e-coli



Persiapan alat dan bahan ekstraksi

Proses ekstarksi

Running PCR Konvensional



Sampel PCR

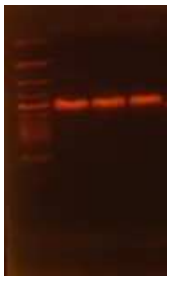
Pembuatan agarose 1,5%

Proses elektroforesis

Visualiasi pita DNA

Lampiran 2

Visualisasi Pita DNA



Gel Red

MB 0,025% 10 Menit

MB 0,025% 15 Menit

MB 0,025% 20 Menit

Gel Red

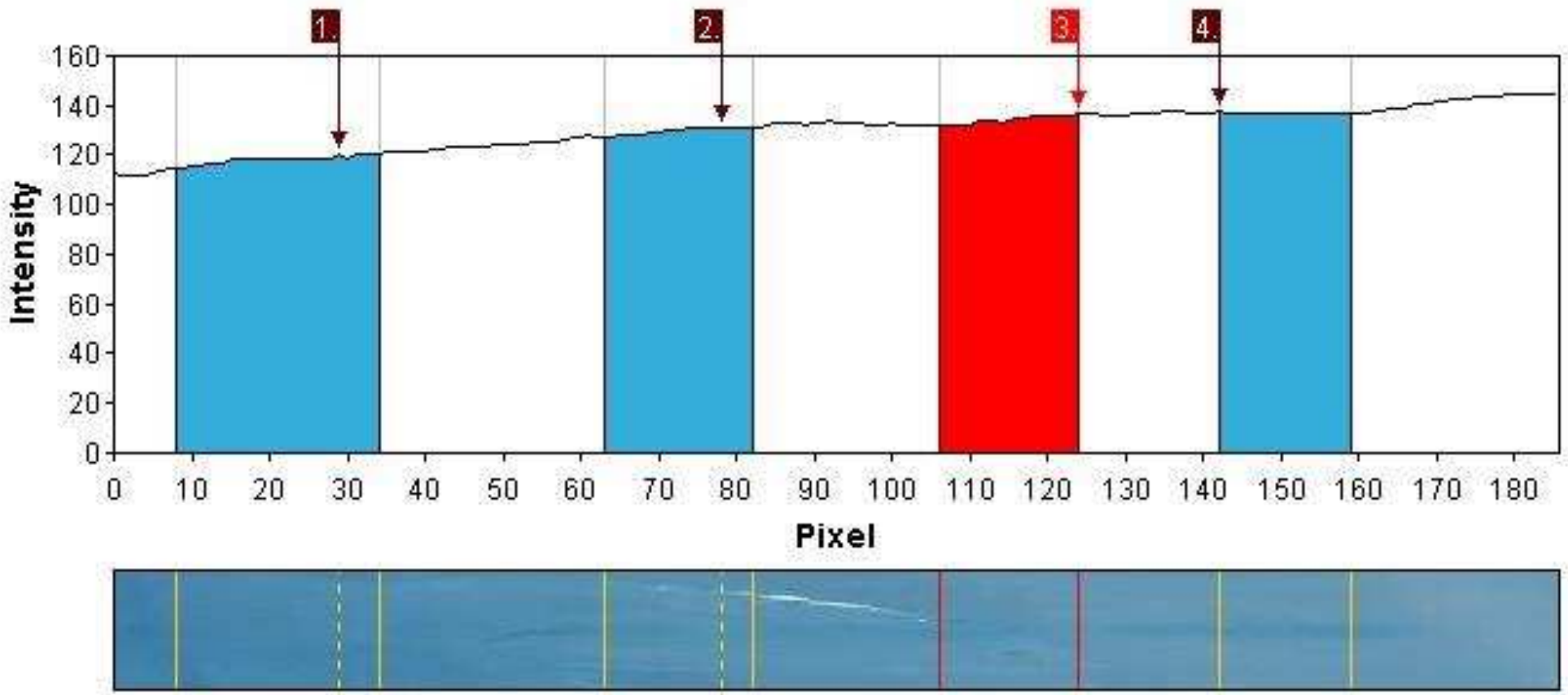
MB Volume Sampel 3 µL

MB Volume Sampel 6µL

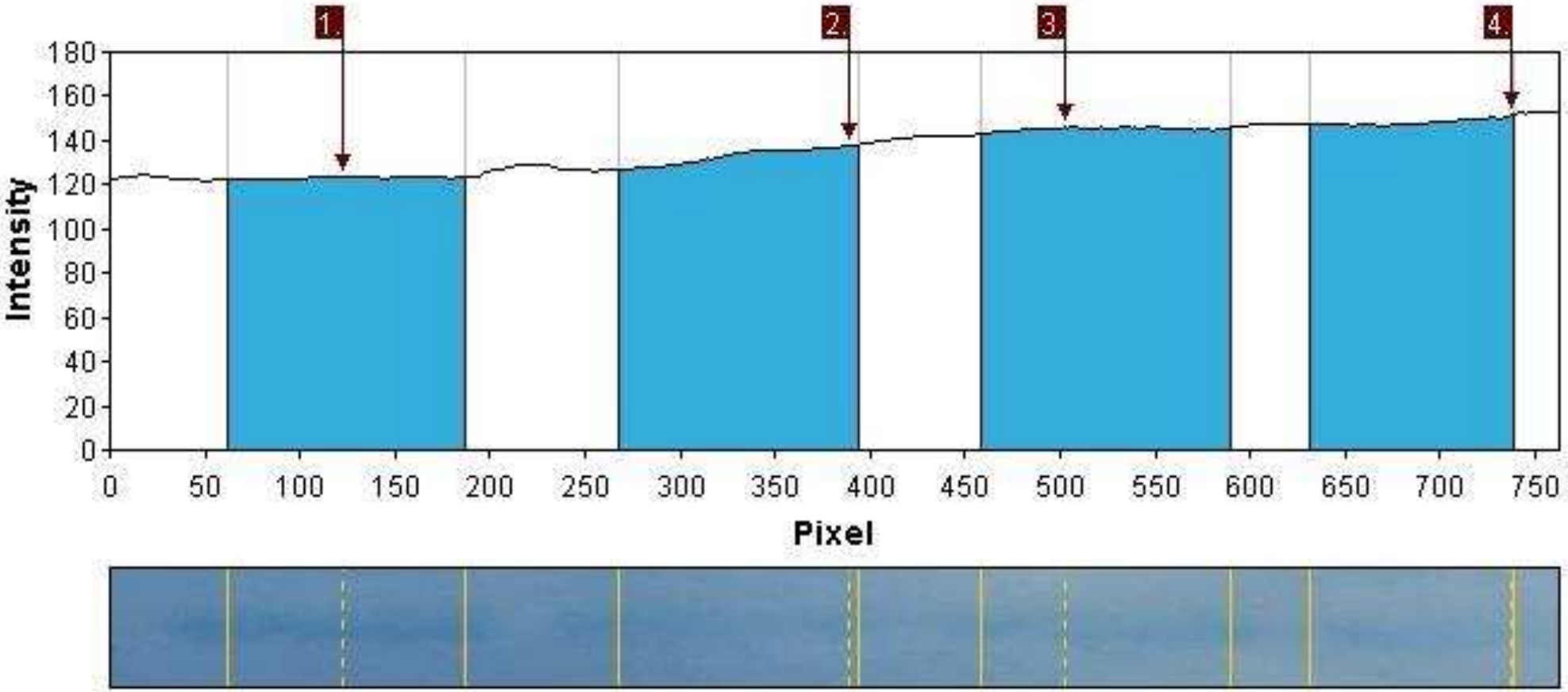
MB Volume Sampel 10 µL

Lampiran 3

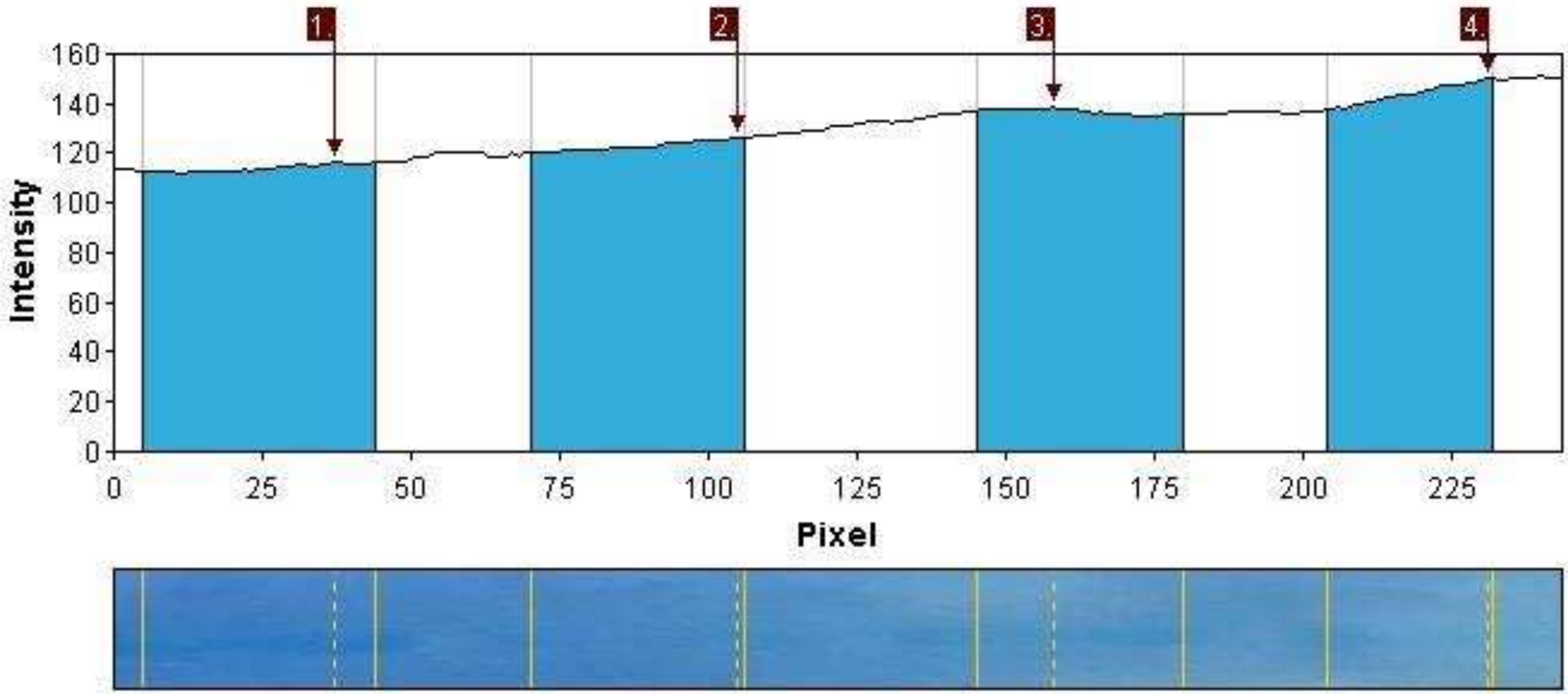
Grafik Intensitas Warna 10 Menit



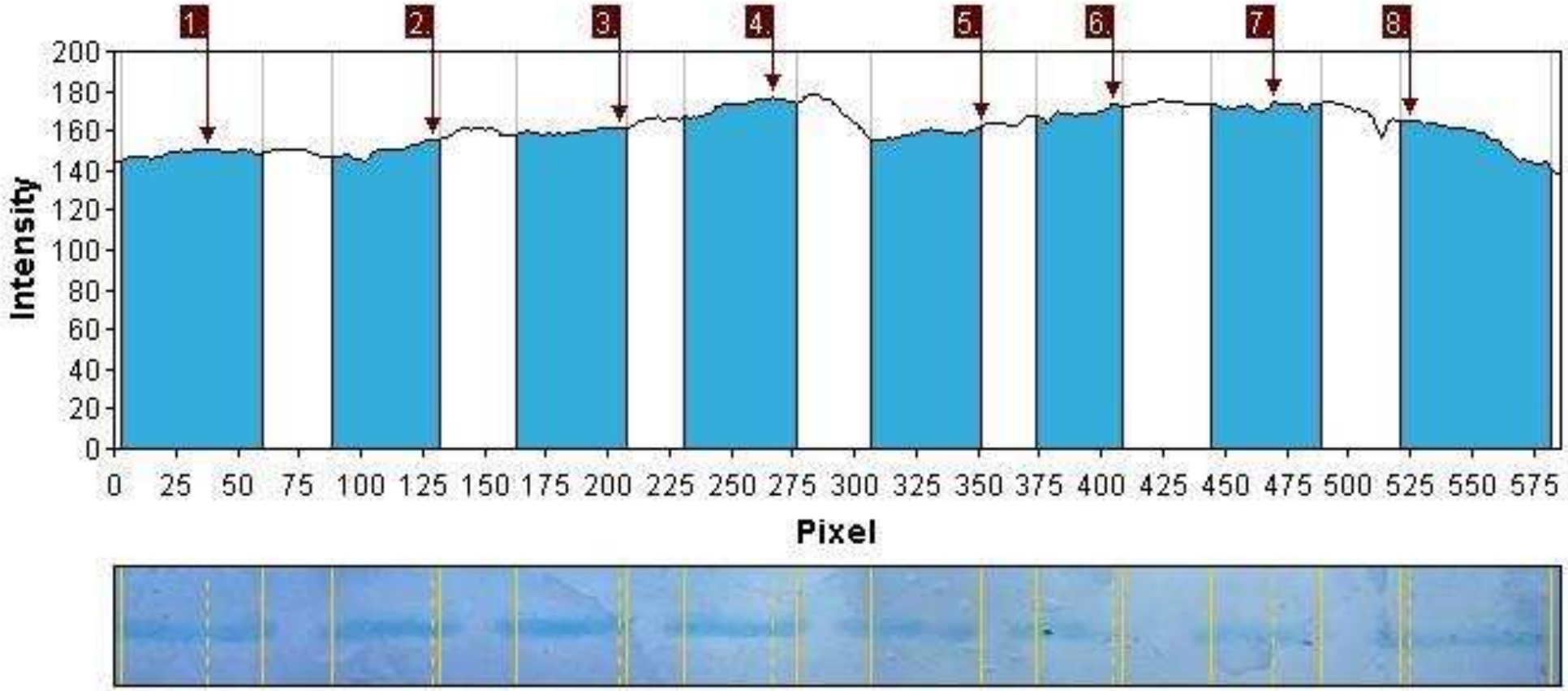
Grafik Intensitas Warna 15 menit



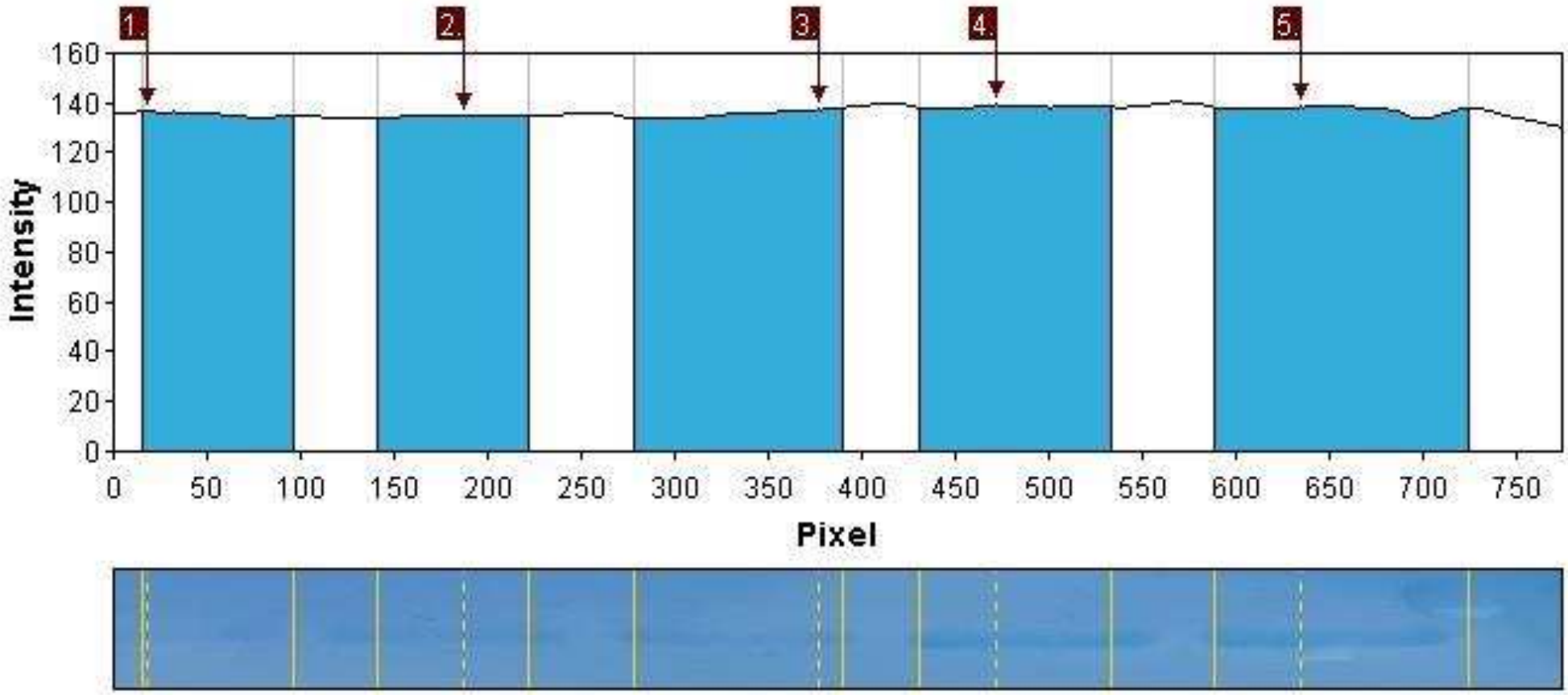
Grafik Intensitas Warna 20 Menit



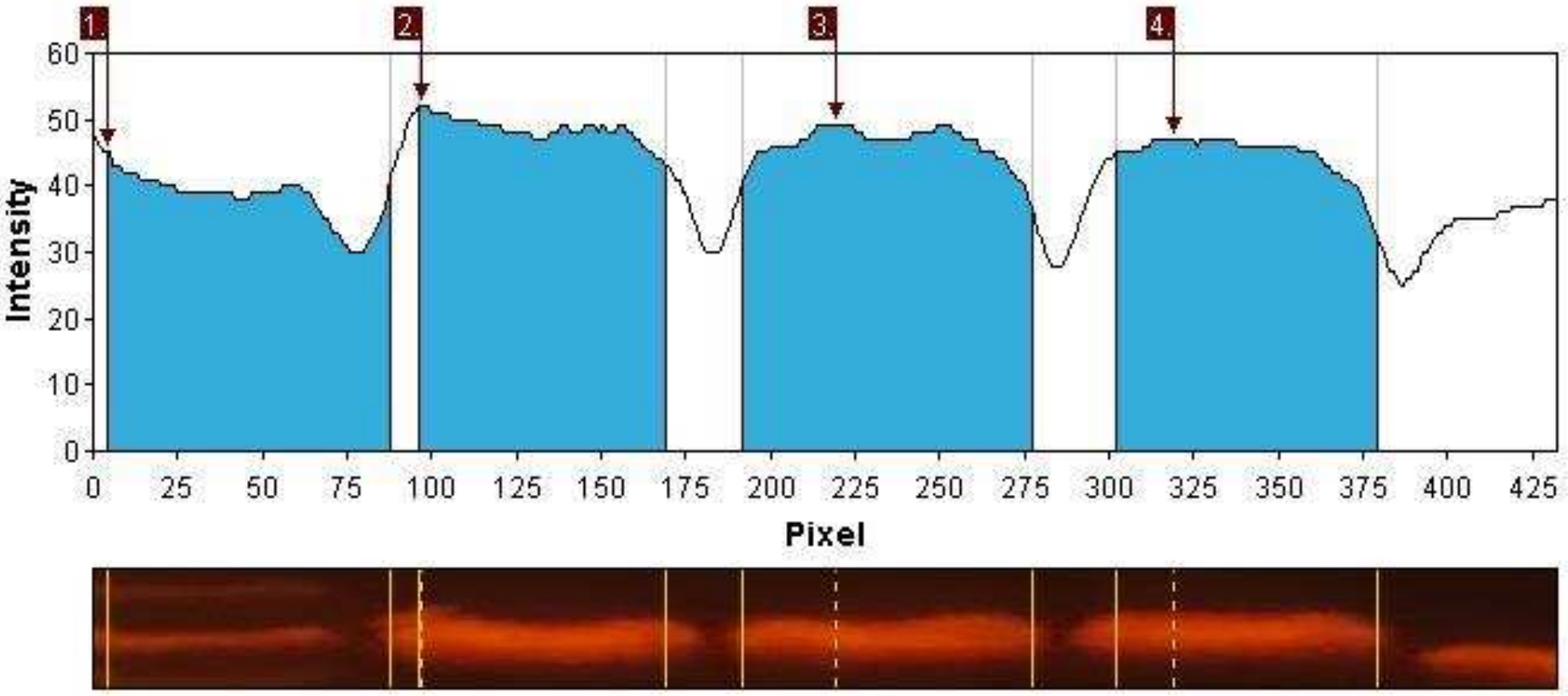
Grafik Intensitas Warna Berdasarkan Volume Sampel (3 dan 6 µL)



Grafik Intensitas warna berdasarkan volume sampel (10 µL)



Grafik Intensitas Warna Band DNA Menggunakan GelRed Sebagai Kontrol



Lampiran 4

Tests of Normality

intensitas_warna	10 menit	.247	4	.	.872	4	.305
	15 menit	.190	4	.	.962	4	.792
	20 menit	.185	4	.	.980	4	.899

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

intensitas_warna	3	.252	4	.	.882	4	.348
	6	.232	4	.	.934	4	.620
	10	.214	4	.	.963	4	.798

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

intensitas_warna

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10 menit	4	131.50	8.266	4.133	118.35	144.65	120	138
15 menit	4	140.00	12.111	6.055	120.73	159.27	124	152
20 menit	4	133.00	14.491	7.246	109.94	156.06	117	150
Total	12	134.83	11.440	3.303	127.56	142.10	117	152

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
intensitas_warna	Based on Mean	.982	2	9	.411
	Based on Median	.853	2	9	.458
	Based on Median and with adjusted df	.853	2	8.721	.459
	Based on trimmed mean	.980	2	9	.412

ANOVA

intensitas_warna

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	164.667	2	82.333	.581	.579
Within Groups	1275.000	9	141.667		
Total	1439.667	11			

Descriptives

intensitas_warna

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3	4	169.00	5.888	2.944	159.63	178.37	163	175
6	4	161.50	11.269	5.635	143.57	179.43	151	177
10	4	137.75	2.217	1.109	134.22	141.28	135	140
Total	12	156.08	15.459	4.463	146.26	165.91	135	177

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
intensitas_warna	Based on Mean	2.675	2	9	.123
	Based on Median	2.244	2	9	.162
	Based on Median and with adjusted df	2.244	2	3.273	.243
	Based on trimmed mean	2.669	2	9	.123

ANOVA

intensitas_warna

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2129.167	2	1064.583	19.172	.001
Within Groups	499.750	9	55.528		
Total	2628.917	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: intensitas_warna

Bonferroni

(I) volume_sampel	(J) volume_sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
3	6	7.500	5.269	.565	-7.96	22.96
	10	31.250*	5.269	.001	15.79	46.71
6	3	-7.500	5.269	.565	-22.96	7.96
	10	23.750*	5.269	.004	8.29	39.21
10	3	-31.250*	5.269	.001	-46.71	-15.79
	6	-23.750*	5.269	.004	-39.21	-8.29

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

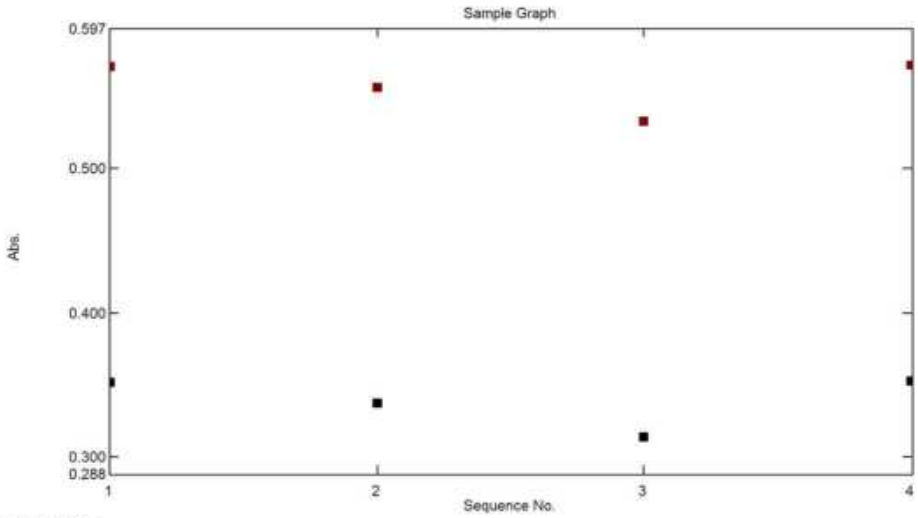
Lampiran 5

Hasil Uji Kuantitas DNA Menggunakan Spektrofotometer

Sample ID	WL260.0	WL280.0	Konsenterasi DNA
1	0,352	0,571	4400
2	0,337	0,556	4212,5
3	0,314	0,533	3925
4	0,352	0,571	4400

Sample Table Report 01/01/2005 00:24:30 AM

File Name: G:\Shimadzu\UVProbe\Data\QC\File_050101_000453.unk



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	WL260.0	WL280.0	Comments
1	1	Unknown		0.352	0.571	
2	2	Unknown		0.337	0.556	
3	3	Unknown		0.314	0.533	
4	4	Unknown		0.352	0.571	
5						

Lampiran 6

LOG BOOK PENELITIAN

Nama : Marita Motik Septi Wulandari

NIM : 2013353016

Judul Skripsi : Sensitivitas Pewarna Methylene Blue Sebagai Alternatif Pewarna DNA Pada Proses Elektroforesis Gel Agarose

No	Hari, tanggal	Kegiatan	Hasil	Paraf
1.	Rabu, 17 April 2024	Sterilisasi alat (2 tabung reaksi)	Didapatkan 2 tabung reaksi steril	Ria
2.	Kamis, 18 April 2024	- Peremajaan Bakteri e- coli - Pembuatan alcohol 70%	Didapatkan 2 tabung bakteri e- coli hasil permajaan	
3.	Jum'at, 19 April 2024	- Ekstraksi DNA - Mastermix PCR - Running PCR	Didapatkan 4 tube DNA hasil ekstraksi dan 4 tube DNA PCR	
4.	Rabu, 24 April 2024	- Uji kuantitas DNA	Didapatkan hasil perhitungan dengan menggunakan spektrofotometer	Dhiny
5.	Jum'at, 3 Mei 2024	- Mastermix PCR - Running PCR	Didapatkan 8 tube DNA hasil PCR	
6.	Senin, 6 Mei 2024	- Pembuatan Gel Agarose 1,5% - Running elektroforesis - Pewarnaan methylene blue dengan variasi waktu pewarnaan - (10, 15 dan 20 menit) - Visualiasi pita DNA hasil pewarnaan dengan methylene blue	Hasil visualisasi : - MB 10 menit : terlihat samar - MB 15 menit : terlihat jelas - MB 20 menit : terlihat jelas - Hasil visualisasi di dapatkan dari pengamatan secara langsung menggunakan mata.	

7.	Selasa, 7 Mei 2024	- Mastermix PCR - Pembuatan gel agarose 1,5 % - Running elektroforesis - Pewarnaan methylene blue dengan variasi volume sampel (3,6,10 µL) - Visualiasi pita DNA	- Didapatkan 4 tube DNA hasil PCR - Hasil Visualiasi : 3 µL : Terlihat jelas sedikit samar. 6 µL : Terlihat jelas 10 µL : Tidak Terlihat **(Diulang)** Hasil visualisasi di dapatkan dari pengamatan secara langsung menggunakan mata.	
8.	Kamis, 16 Mei 2024	**Pengulangan** - Mastermix PCR - Running PCR - Pembuatan agarose 1,5% - Running elektroforesis - Perlakuan variasi volume sampel 10 µL	- Di dapatkan 4 tube DNA hasil PCR - Visualisasi 10 µL : Terlihat Jelas	

Mengetahui

Pembimbing Utama

Nurminha, S.Pd.,M.Sc

Pembimbing Pendamping,

Hartanti, S.Si.,M.Si

Lampiran 7

KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN
SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN
POLITEKNIK KESEHATAN TANJUNGKARANG
Jl. Soekarno - Hatta No. 6 Bandar Lampung
Telp : 0721 - 783 852 Faxsimile : 0721 - 773 918
Website : http://poltekkes-tjk.ac.id E-mail : direktorat@poltekkes-tjk.ac.id

KETERANGAN LAYAK ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL EXEMPTION
"ETHICAL EXEMPTION"

No.185/KEPK-TJK/II/2024

Protokol penelitian versi 1 yang diusulkan oleh :
The research protocol proposed by

Peneliti utama : Marita Motik Septi Wulandari
Principal In Investigator

Nama Institusi : Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang
Name of the Institution

Dengan judul:
Title

"Sensitivitas Pewarna Methylen Blue Sebagai Alternatif Pewarna DNA pada Proses Elektroforesis Agarose"

"Sensitivitas Pewarna Methylen Blue Sebagai Alternatif Pewarna DNA pada Proses Elektroforesis Agarose"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Concent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 19 Februari 2024 sampai dengan tanggal 19 Februari 2025.

This declaration of ethics applies during the period February 19, 2024 until February 19, 2025.

February 19, 2024
Professor and Chairperson,

Dr. Aprina, S.Kp., M.Kes

Lampiran 8

KARTU BIMBIMNGAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK PROGRAM SARJANA TERAPAN
TAHUN AKADEMIK 2023-2024

Nama Mahasiswa : Marita Motik Septi Wulandari
NIM : 2013353016
Judul Skripsi : Sensitivitas Pewarna Methylene Blue Sebagai Alternatif Pewarna DNA Pada Proses Elektroforesis Gel Agarose
Pembimbing Utama : Nurminha, S.Pd.,M.Sc

No	Tanggal Bimbingan	Materi Bimbingan	Keterangan	paraf
1.	3/Januari/2024.	BAB 1 (Latar Belakang, Tujuan, Rumusan, Ruang Lingkup)	Revisi Bab 1	
2.	22/Januari/2024	BAB 1,2,3 (Pendahuluan, Tinjauan Teori, Metodelogi Penelitian)	Revisi Bab 1,2,3	
3.	25/Januari/2024	BAB 1,2,3	Revisi.	
4.	5/Februari/2024	Bab 1,2,3	Revisi	
5.	6/Februari/2024	Bab 1,2,3	ACC Sempro	
6.	12/Februari/2024	Bab 1,2,3 (Pendahuluan, Tj. Pustaka, Metodelogi Penelitian)	ACC Revisi Sempro	
7.	17/April/2024	Bab 1,2,3	ACC Penelitian	

No	Tanggal Bimbingan	Materi Bimbingan	Keterangan	paraf
8.	3/juni/2024.	Bab IV, V (Pembahasan dan Hasil)	Revisi	
9.	11/juni/2024	Bab IV, V (Hasil dan Pembahasan)	Revisi.	
10.	13/juni/2024	Bab I, II, III, IV	Acc seminar hasil	
12	20/Juni/2024	Perbaikan setelah seminar hasil	Revisi	
13	27/Juni/2024	Perbaikan setelah seminar hasil	Revisi	
14.	30/juni/2024	Bab I, II, III, IV, V dan Lampiran	Acc Cetak	

Catatan : Coret yang tidak perlu*

Ketua Prodi TLM Program Sarjana Terapan

Nurminha, S.Pd.,M.Sc
NIP. 196911241989122001

KARTU BIMBIMNGAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK PROGRAM SARJANA TERAPAN
TAHUN AKADEMIK 2023-2024

Nama Mahasiswa : Marita Motik Septi Wulandari
NIM : 2013353016
Judul Skripsi : Sensitivitas Pewarna Methylene Blue Sebagai Alternatif Pewarna DNA Pada Proses Elektroforesis Gel Agarose
Pembimbing Pendamping : Hartanti, S.Si.,M.Si

No	Tanggal Bimbingan	Materi Bimbingan	Keterangan	paraf
1.	4/Januari/2024	Bab 1,2,3	Revisi Bab 1	
2.	24/Januari/2024	BAB 1,2,3	Revisi Bab 1,2,3	
3.	30/Januari/2024	Bab 1,2,3	Revisi	
4.	7/Februari/2024	Bab 1,2,3	Revisi	
5.	13/Februari/2024	Bab 1,2,3	ACC Sempro	
6.	16/April/2024	Proposal fix (Bab 1,2,3)	ACC Penelitian	
7.	20/Mei/2024	Bimbingan hasil penelitian	Lanjutkan Bab IV, V	

No	Tanggal Bimbingan	Materi Bimbingan	Keterangan	paraf
8.	22/Mei/2024	Bab IV, V (Hasil dan Pembahasan)	Revisi	
9.	30/Mei/2024	Bab IV, V (Hasil dan Pembahasan)	Revisi.	
10.	4/juni/2024	Bab IV, V (Hasil, Pembahasan, Simpulan, Saran)	Revisi	
11.	14/juni/2024	Bab I, II, III, IV	Revisi	
12.	19/juni/2024	Bab I, II, III, IV	Acc seminar	
13.	21/juni/2024.	Bab I, II, III, IV, V, Lampiran	Revisi	
14.	28/juni/2024	Bab I, II, III, IV, V, Lampiran.	Acc cetak	

Catatan : Coret yang tidak perlu*

Ketua Prodi TLM Program Sarjana Terapan

Nurminha, S.Pd.,M.Sc
NIP. 196911241989122001

Lampiran 9

CEK TURNITIN BAB 1-5-1.docx

ORIGINALITY REPORT

27%	26%	5%	7%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repository.poltekkes-tjk.ac.id Internet Source	5%
2	idoc.pub Internet Source	4%
3	adoc.pub Internet Source	2%
4	lp2m.stikesayani.ac.id Internet Source	1%
5	www.scribd.com Internet Source	1%
6	text-id.123dok.com Internet Source	1%
7	123dok.com Internet Source	1%
8	repository.poltekkes-denpasar.ac.id Internet Source	1%
9	repository.ub.ac.id Internet Source	1%

SENSITIVITAS PEWARNA METHYLENE BLUE SEBAGAI ALTERNATIF PEWARNA DNA PADA PROSES ELEKTROFORESIS AGAROSE

Marita Motik[1], Nurminha[2] , Hartanti [3]
[1]Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang

Abstrak

Elektroforesis merupakan salah satu tahapan penting dari PCR Kovensional. Untuk memvisualisasi hasil elektroforesis diperlukan pewarna salah satunya adalah ethidium bromide. Namun, ethidium bromide bersifat mutagenik dan karsinogenik. Pewarna alternatif untuk mewarnai DNA yang aman, murah dan mudah ditemukan adalah methylene blue. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis gel agarose. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variable bebas adalah pewarna methylene blue dan variable terikat adalah pita DNA pada proses elektroforesis. Data diolah dengan menggunakan gel analyzer dan uji statistik one way anova untuk melihat perbedaan lama waktu kontak pewarnaan dengan berbagai variasi (10, 15 dan 20 menit) dengan hasil sig = 0,579, tidak terdapat perbedaan bermakna. Selain itu, uji annova digunakan untuk melihat perbedaan variasi volume sampel (3,6,dan 10 µL) dengan hasil sig = 0,001, terdapat perbedaan bermakna. Lama kontak pewarnaan yang paling optimal adalah 15 menit. Volume sampel yang paling optimal adalah 3 µL. Dilanjutkan dengan uji sensitivitas dengan melihat perbandingan intensitas warna dengan GelRed. Berdasarkan analisis menggunakan gel analyzer methylene blue lebih sensitive dibandingkan dengan GelRed.

Kata Kunci : Elektroforesis,Methylene Blue, Lama waktu kontak, Volume sampel, Sensitivitas

" METHYLENE BLUE DYE SENSITIVITY AS AN ALTERNATIVE TO DNA DYE IN AGAROSE ELECTROPHORESIS PROCESSING

Abstract

Electrophoresis is one of the important stages of Coventional PCR. To visualise the electrophoresis results, a dye is needed, one of which is ethidium bromide. However, ethidium bromide is mutagenic and carcinogenic. An alternative dye to colour DNA that is safe, cheap and easy to find is methylene blue. The purpose of this study was to determine the sensitivity of methylene blue dye as an alternative DNA dye in the process of agarose gel electrophoresis. The type of research used is experimental with a complete randomised design (RAL) research design. The independent variable is methylene blue dye and the dependent variable is the DNA band in the electrophoresis process. Data were processed using gel analyser and one way anova statistical test to see the difference in the length of contact time with various variations (10, 15 and 20 minutes) with sig = 0.579, there is no significant difference. In addition, the annova test was used to see the difference in sample volume variations (3, 6, and 10 µL) with sig = 0.001, there is a significant difference. The most optimal staining contact time was 15 minutes. The most optimal sample volume was 3 µL. Followed by sensitivity test by looking at the comparison of colour intensity with GelRed. Based on analysis using gel analyser methylene blue is more sensitive than GelRed
Keywords: : Electrophoresis, Methylene Blue, Length of contact time, Sample volume, Sensitivity.

Korespondensi: Marita Motik Septi Wulandari, Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Kemenkes Tanjungkarang, Jalan Soekarno-Hatta No. 1 Hajimena Bandar Lampung, *mobile* 082373270995, *e-mail* maritamotiksetiwulandari@gmail.com

Pendahuluan

Saat ini perkembangan teknologi khususnya di bidang kesehatan berkembang sangat pesat, berbagai metode telah dikembangkan untuk mendapatkan informasi kesehatan secara akurat dan presisi dalam bidang pemeriksaan laboratorium, salah satunya dengan menggunakan pendekatan berbasis molekuler, yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Dewantoro dkk., 2020).

Metode PCR ini merupakan metode yang sangat akurat untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi asam nukleat. PCR memiliki sensitivitas yang sangat baik karena dapat mengampilikasi kurang dari 10 salinan target DNA (Watzinger dkk., 2006). Prinsip pemeriksaan PCR ini adalah memperbanyak sekuens target secara *in vitro*. PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi sehingga pemeriksaan yang dilakukan lebih akurat (Ainun dkk., 2018). Tahapan deteksi dengan menggunakan PCR konvensional meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA, dan visualisasi produk PCR.

Tahapan pertama yang harus dilakukan dalam menunjang pemeriksaan PCR adalah tahap isolasi DNA. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA atau RNA dengan material lain seperti protein, lemak, dan juga karbohidrat. Teknik isolasi DNA merupakan gabungan dari metode fisika, kimia dan enzimatik. Tahapan isolasi DNA terdiri dari perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari komponen lainnya dan pemurnian DNA. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah dan kualitas DNA yaitu metode spektrofotometri dan elektroforesis (Ainun dkk., 2018).

Agar elektroforesis berjalan dengan cepat, tepat, dan efektif, digunakan pewarna ethidium bromide (EtBr) sebagai pewarna yang paling umum digunakan pada proses elektroforesis. EtBr bekerja dengan cara menginterkalasi dirinya dalam molekul DNA.

Etidhium bromide (EtBr) bersifat mutagenik dan karsinogenik karena dapat berinterkalasi dengan DNA utas ganda yang terdapat pada manusia. Adanya interkalasi dapat mengakibatkan gangguan dalam proses biologis seperti replikasi DNA dan transkripsi (Nataprawira dkk., 2022). Selain itu, untuk melihat DNA yang telah diwarnai dengan EtBr juga membutuhkan sinar UV, dimana sinar UV dengan panjang gelombang yang pendek merupakan sinar yang berbahaya, selain itu penanganan limbah dari gel agarose yang telah diwarnai dengan EtBr juga harus dibuang sebagai bahan yang berbahaya dan menggunakan peralatan khusus (Sigmon, 1996).

Saat ini, para peneliti mulai mencari alternatif pewarna DNA untuk mengindari bahaya yang ditimbulkan dari pewarna EtBr. Salah satunya adalah penggunaan pewarna fluorescent yang memiliki kecepatan dan sesitivitas yang tinggi untuk memvisualisasi DNA. Namun pewarna fluorescent ini seringkali kurang stabil jika dibandingkan dengan EtBr dan memiliki harga yang lebih mahal jika dibandingkan dengan EtBr (Hilal & Taylor, 2008). Alternatif pewarna DNA lainnya adalah ethyl violet, acridine orange, crystal violet, SYBR safe, SYBR green I, GelRed, BlueView, DAPI dan methylene blue. GelRed, DAPI, SYBR green I memiliki sensitivitas yang hampir sama dengan EtBr, namun membutuhkan biaya yang tinggi karena harganya yang lebih mahal jika Dibandingkan dengan EtBr (Nafisi dkk., 2007).

Pewarna alternatif untuk pewarna DNA yang aman, murah dan mudah ditemukan adalah methylene blue. Methylene blue adalah senyawa trisiklik heteroaromatik yang dapat berikatan kuat dengan DNA juga biasanya digunakan untuk perawatan dan pewarna dalam test laboratorium (Silvestrini dkk., 2015). Pewarna methylene blue ini mewarnai DNA melalui proses interkalasi, yang mirip dengan pengikatan ethidium bromida pada DNA.

Keuntungan menggunakan metyhlene blue adalah toksisitas dari methylene blue yang rendah, tidak bersifat karsinogenik, dan lebih murah jika Dibandingkan dengan ethidium bromida, dapat digunakan kembali selama 3 sampai 6 bulan (Nafisi dkk., 2007). Selain itu pewarna methylene blue tidak memerlukan sinar UV untuk memvisualisaikan pita DNA sehingga mengurangi terjadinya mutasi.

Penelitian mengenai penggunaan metyhlen blue sebagai alternatif pewarna DNA pernah diteliti oleh Winarti (2017). Hasil penelitian tersebut diperoleh bahwa konsentrasi methylene blue yang optimal adalah 0,0125% dengan waktu kontak pewarnaan selama 25 menit yang dilakukan pada konsenterasi agarose 2% dan kondisi elektroforesis dilakukan pada tegangan 150 volt selama 30 menit (Winarti., 2017).

Penelitian lanjutan terkait dengan optimasi methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA juga dilakukan oleh Merdekawati (2021). Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa pita DNA 100 bp dan 250 bp dapat tervisualisasi dengan menggunakan konsenterasi 0,025% methylene blue dengan konsenterasi agarose 1,5% waktu kontak pewarnaan dengan waktu 20 menit dan waktu

destaining adalah 30 menit. Kondisi elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt dalam waktu 60 menit. Jumlah volume sample yang ditambahkan adalah 10 mikrolitter. Namun, pada penelitian tersebut belum dilakukan penelitan terkait dengan sensitivitas dari pewarna methylene e blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis (Merdekawati dkk., 2021).

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk meneliti terkait dengan sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis dengan memvariasikan volume sampel yang diberikan dan waktu pewarnaan,

Metode

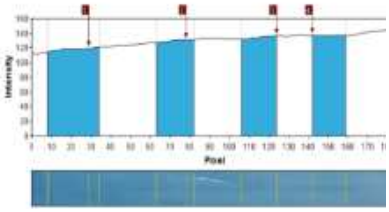
Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan desain penelitiannya adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji laboratorium menggunakan metode elektroforesis untuk melihat sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose. Variabel bebas adalah pewarna methylene blue. Variabel terikat adalah pita DNA pada proses elektroforesis. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Penelitian Ini dilaksanakan pada bulan April – Mei 2024. Subjek penelitian adalah methylene blue yang digunakan sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis. Dengan sampel yang digunakan adalah kultur bakteri *Eschericia coli* yang diperoleh dari koleksi laboratorium bakteriologi Poltekkes KemenkesTanjungkarang. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan, jumlah pengulangan berdasarkan rumus Federer. Intensitas warna pita DNA di ukur menggunakan software Gel Analyzer. Data yang terkumpul selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis statistika dengan menggunakan analisa univariat dan bivariat. Analisa bivariat dilakukan menggunakan Uji One Way Annova dilanjutkan dengan uji Post hoc dengan menggunakan aplikasi Statistical Program For Social Science (SPSS).

Hasil

1. Intensitas warna pita DNA berdasarkan waktu pewarnaan

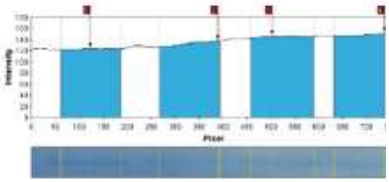
Perendaman 10 menit

Grafik Gel Analyzer 10 menit



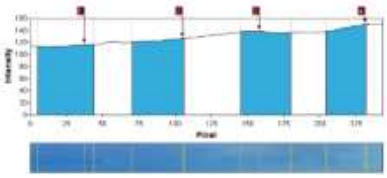
Perendaman 15 menit

Grafik Gel Analyzer 15 menit



Perendaman 15 menit

Grafik Gel Analyzer 15 menit



Tabel 1.2 Intensitas warna pita DNA berdasarkan lama waktu pewarnaan

Lama Kontak Pewarnaan (menit)`	Intensitas Warna Pita DNA (Arb) Pengulangan				Rata–Rata
	1	2	3	4	
10	120	131	137	138	132
15	124	138	146	152	140
20	117	126	139	150	133

Berdasarkan tabel 1.1 diketahui rata-rata intensitas warna tertinggi yaitu 140 arb diperoleh pada perendaman gel agarose dengan lama pewarnaan 15 menit. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan tersebut merupakan kondisi yang ideal menghasilkan warna pita DNA dengan sangat jelas dibandingkan pada lama kontak 10 menit dan 15 menit

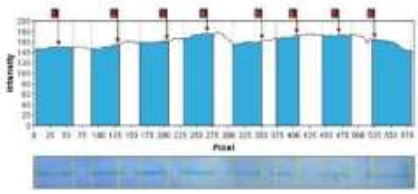
Gambar 1.1 Grafik lama pewarnaan terhadap intensitas warna

Hasil uji statistik menunjukkan data hasil pewarnaan DNA dengan variasi lama waktu pewarnaan selama 10, 15 dan 20 menit menggunakan methyelene blue terhadap intensitas warna pita DNA. Berdasarkan tabel tersebut diperoleh nilai signifikansi 0,579 (sig > α = 0,05). Berdasarkan nilai signifikansi dari tabel uji anova dapat disimpulkan bahwa Ho diterima dan Ha ditolak yang artinya tidak ada perbedaan bermakna antara intensitas warna pita DNA dengan lama waktu kontak pewarnaan methyelen blue (10, 15 dan 20 menit). Hasil uji statistika ini menunjukkan bahwa diantara 3 perlakuan lama kontak pewarnaan 10,15 dan 20 menit tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap intensitas warna yang berarti bahwa ketiga waktu tersebut sama- sama bisa digunakan untuk memvisualisaikan pita DNA dengan baik.

2. Intensitas warna pita DNA berdasarkan volume sampel

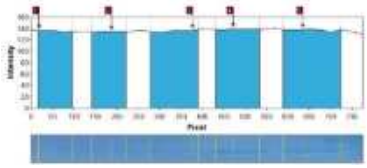
Volume Sampel 3 , 6 µL

Grafik Gel Analyzer 3 , 6 µL



Volume Sampel 10 µL

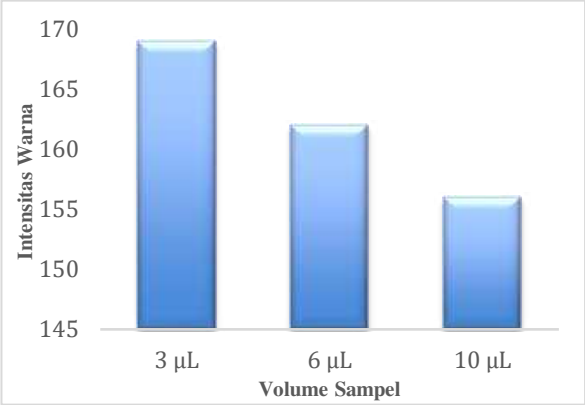
Grafik Gel Analyzer 10 µL



Tabel 1.2 Intensitas warna pita DNA berdasarkan volume sampel

Volume Sampel (µL)	Intensitas Warna Pita DNA (Arb) Pengulangan				Rata–Rata
	1	2	3	4	
3	163	173	175	165	169
6	151	156	162	177	162
10	137	135	138	140	156

Berdasarkan tabel 1.2 diketahui rata-rata intensitas warna tertinggi yaitu 169.00 diperoleh pada perlakuan pemberian sampel sebanyak 3 µL. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan tersebut merupakan kondisi yang ideal menghasilkan warna pita DNA yang jelas. Selanjutnya untuk mengetahui ada tidak nya pebedaan yang bermakna anatara ketiga perlakuan variasi volume sampel yang digunakan maka dilakukan analisa secara univariat dan bivariat. Analisa univariat yang dilakukan adalah uji normalitas Shapiro wilk dan analisa bivariat yang dilakukan adalah uji one way annova.

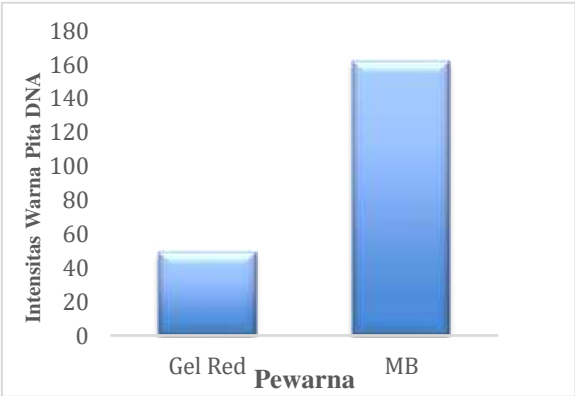


Gambar 1.1 Grafik lama pewarnaan terhadap intensitas warna

Hasil uji statistik menunjukkan data hasil pewarnaan DNA dengan variasi volume sampel (3,6,10 µL) menggunakan methyelene blue terhadap intensitas warna pita DNA. Dari tabel tersebut diperoleh nilai signifikansi 0,001 (sig < α = 0,05). Berdasarkan nilai signifikansi dari tabel uji anova dapat disimpulkan bahwa Ho ditolak dan Ha diterima yang artinya ada perbedaan bermakna antara intensitas warna pita DNA dengan variasi volume sampel (3,6,10 µL). Berdasarkan grafik diatas terdapat perbedaan bermakna pada perlakuan volume sampel 3 µL dan 10 µL serta 6 µL dan 10 µL .

3. Sensitivitas Pewarna Methylene Blue Dibandingkan Dengan GelRed

Uji sensitivitas dilakukan untuk melihat perbandingan rata- rata intensitas warna pita DNA antara gel red dan Methylen Blue



Gambar 4.3 Grafik sensitivitas methylene blue

Berdasarkan software gel analyzer yang dapat diketahui bahwa rata- rata intensitas warna pita DNA menggunakan methylene blue lebih tinggi yaitu 162 dibandingkan dengan mean intensitas warna pita DNA menggunakan GelRed. Perbandingan ini dilakukan pada kondisi volume sampel 6 µL. Berdasarkan analisis yang telah dilakukan, pita DNA yang diwarnai dengan methylene blue juga dapat terlihat pada volume sampel 3 µL, yang menunjukkan bahwa pewarna methyelen blue lebih sensitive dibandingkan dengan gelRed karena pewarna methylene blue padat memvisualisasikan pita DNA dengan volume sampel dibawah 6 µL.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat diketahui bahwa hasil pewarnaan DNA menggunakan methylene blue terlihat jelas seperti ketika menggunakan GelRed. Perbedaan lama waktu pewarnaan dan variasi volume sampel berpengaruh terhadap resolusi warna pita DNA yang dihasilkan. Pada penelitian ini, bertujuan untuk mencari lama waktu pewarnaan terbaik yang dapat menghasilkan pita DNA terbaik yang di ukur menggunakan software bernama gel analyzer, dan didapatkan hasil bahwa perendaman gel agarose dengan waktu selama 15 menit adalah hasil yang terbaik didapatkan dari analisa menggunakan gel analyzer. Pada lama pewarnaan 10 menit, pita DNA sudah mulai terlihat tetapi pita DNA yang terlihat masih samar dan kurang terlihat jelas secara kasat mata. Pada lama pewarnaan 20 menit pita DNA terlihat jelas, tetapi warna latar belakanggel agarose sudah terlalu biru yang menandakan methyelene blue sudah mulai berikatan dengan DNA dan juga dengan agarose. Warna background yang sudah terlalu pekat juga berpengaruh terhadap hasil yang di dapatkan pada gel analyzer. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Merdekawati (2021) didapatkan hasil pewarnaan terbaik adalah lama waktu pewarnaan selama 20 menit yang di visualisaikan menggunakan indra pengelihatan, tetapi penelitian ini didapatkan hasil bahwa lama waktu pewarnaan terbaik adalah selama 15 menit, karena jika di analisis dengan gel analzer pada pewarnaan 20 menit pita DNA sudah tidak terlihat dengan jelas yang diakibatkan karena background yang dihasilkan terlalu biru

Pengamatan hasil pewarnaan DNA mengunakan methyelene blue menunjukkan adanya perubahan resolusi warna pita DNA serta intensitas warna *background* yang semakin lama direndam akan semakin pekat. Hal ini sesuai dengan persamaan laju reaksi kimia bahwa semakin lama waktu yang digunakan, maka semakin banyak pula ikatan yang terbentuk sedangkan partikel reaktan yang dalam hal ini

adalah methylene blue akan semakin berkurang (Merdekawati dkk, 2021). Methyelene blue dengan konsenterasi yang lebih tinggi akan lebih cepat berdifusi ke dalam pori – pori gel agarose dan berikatan dengan DNA. Banyaknya ikatan antara methylene blue dengan DNA akan menghasilkan pita DNA yang lebih jelas. Namun waktu yang terlalu lama dan juga konsenterasi yang terlalu tinggi juga dapat menurunkan resolusi pita DNA dikerenakan warna background yang terlalu pekat.

Pengamatan hasil pewarnaan DNA mengunakan methyelene blue menunjukkan adanya perubahan resolusi warna pita DNA serta intensitas warna *background* yang semakin lama direndam akan semakin pekat. Hal ini sesuai dengan persamaan laju reaksi kimia bahwa semakin lama waktu yang digunakan, maka semakin banyak pula ikatan yang terbentuk sedangkan partikel reaktan yang dalam hal ini adalah methylene blue akan semakin berkurang (Merdekawati dkk, 2021). Methyelene blue dengan konsenterasi yang lebih tinggi akan lebih cepat berdifusi ke dalam pori – pori gel agarose dan berikatan dengan DNA. Banyaknya ikatan antara methylene blue dengan DNA akan menghasilkan pita DNA yang lebih jelas. Namun waktu yang terlalu lama dan juga konsenterasi yang terlalu tinggi juga dapat menurunkan resolusi pita DNA dikerenakan warna background yang terlalu pekat.

Berdasarkan studi literatur dan penelitian sebelumnya, dinyatakan bahwa methylene blue dapat mewarnai DNA meskipun sensitivititasnya lebih rendah dibandingkan pewarna pembanding. Mekanisme pengikatan methylene blue dan DNA terjadi melalui ikatan semi interkalasi dan elektrostatik. Ikatan interkalasi terjadi ketika struktur cincin aromatik methyelene blue planar atau heteroaromatik disisipkan di antara pasangan basa DNA yang berdekatan tanpa mengganggu susunannya secara keseluruhan. Ketika interkalasi terjadi, jarak vertikal antara pasangan basan DNA menjadi lebih jauh, mengakibatkan perubahan Tingkat rotasi (sudut puntiran) struktur DNA. Ikatan elektrostatik terjadi antara ligan kationik dalam methylene blue dengan gugus fosfat yang bermuatan negative dalam DNA. Interaksi ini tidak spesifik dan menghasilkan pengikatan eksternal di sepanjang untai DNA Ikatan methyelene blue dan DNA adalah proses dimana molekul Methylene Blue yang berupa kationik berikatan dengan DNA(Merdekawati dkk, 2021).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa berdasarkan pada software gel analyzer lama waktu pewarnaan methylene blue yang optimal untuk pewarnaan DNA hasil elektroforesis gel agarose adalah 15 menit. Volume sampel yang paling optimal untuk pewarnaan DNA hasil elektroforesis gel agarose adalah 3 µL. Methylene blue lebih sensitive dibandingkan dengan GelRed untuk mewarnai DNA hasil elektroforesis gel agarose.

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang variasi volume sampel yang lebih banyak untuk melihat limit deteksi pewarna Methylene Blue dapat memvisualisikan pita DNA. Selanjutnya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan software pembaca pita DNA yang berbeda.

Daftar Pustaka

Adrin, G.Ri. (2017) 'Isolasi Agarosa Dari Agar Dan Aplikasinya Sebagai Adsorben Zat Warna Pada Analisis Tartrazin Dengan Metoda Tlc Scanner', *Solasi Agarosa Dari Agar Dan Aplikasinya Sebagai Adsorben Zat Warna Pada Analisis Tartrazin Dengan Metoda Tlc Scanner*

Ainun Qolbi Wasdili, F., Gartinah, T., Kesehatan, A., Jenderal Achmad Yani Cimahi, S., & Kesehatan Daerah Provinsi Jawa Barat, L. (2018). *Penentuan Kualitas Isolasi DNA Salmonella Dengan Metode Spektofotometri dan Elektroforesis*. Dalam *Jenderal Achmad Yani Cimahi PINLITAMAS 1* | (Vol. 1, Nomor 1).

Artika, I. M. (2023). *Teknik Manipulasi Gen.* Bogor: IPB Press

Dewantoro, A., Citra Anggundari, W., Nuraeni, U., Prasetya, B., Yopi, D., & Nasional, B. S. (2020). *Metode Deteksi Molekuler Berbasis Genomik dan Diagnostik Akurasinya dalam Pengembangan Diagnostik Klinik di Indonesia*

Dewi Nataprawira, S. M., Sidarta, E., & Chris, A. (2022). *Optimasi Gelred sebagai* Pewarna *DNA dalam Biologi Molekuler*. *12*(7).

Fatchiyah. (2021). *Biologi Molekuler* .

H.Alnamoly, M., Alzohairy, A.M. and El-Henawy, I.M. (2020) 'A survey on gel images analysis software tools', *Journal of Intelligent Systems and Internet of Things*, (January 2020), pp. 40–47.

Hilal, H., & Taylor, J. A. (2008). Cyanine dyes for the detection of double stranded DNA. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *70*(6), 1104–1108.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, *62*. https://doi.org/10.3791/3923

Merdekawati, F., Gustira Rahayu, I., & Khoirul Abror, Y. (2021). Methylene Blue As Alternative DNA Staining In Elektroforesis. 16–17

Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F., & Tajmir-Riahi, H. A. (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene e blue. *Journal of Molecular Structure*, *827*(1–3), 35–43.

Nurhayati, B. (2017). *Bahan Ajar TLM Biologi Molekuler*

Rohs, R. (2012). Methylene e Blue Binding to DNA with Alternating AT. *Sciene Direct*

Silvestrini, M., Fruk, L., Moretto, L. M., & Ugo, P. (2015). Detection of DNA hybridization by methylene e blue electrochemistry at activated nanoelectrode ensembles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *15*(5), 3437–3442. https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10214

Watzinger, F., Ebner, K., & Lion, T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Dalam *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 27,Nomor2–3, hlm. 254–298). https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.001

Yahya, L., Ita, U., & Fredy, K. (2016). Pemanfaatan Nata de Coco sebagai Media Gel Elektroforesis Pada Zat Warna Remazol : Pengaruh pH, Waktu dan Aplikasi Pemisahan Gelatin. *Jurnal Sains dan Teknik* , *5*.