

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tinjauan Teori

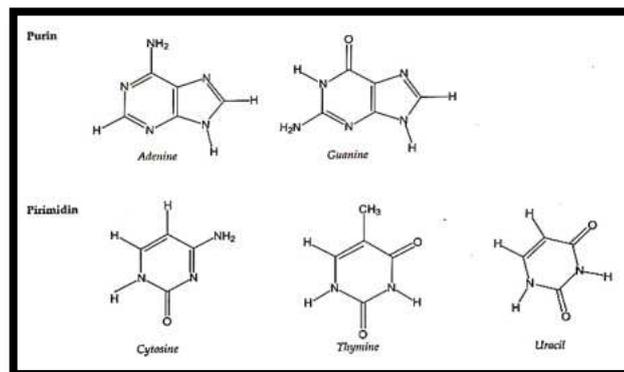
#### 1. *Deoxyribonucleic Acid (DNA)*.

DNA adalah salah satu bagian dari asam nukelat. DNA dalam tubuh berfungsi sebagai biosintesis protein dan sebagai pembawa sifat keturunan/genetik. Asam nukelat merupakan bagian dari mononukleotida. mononukleotida merupakan monomer dari asam nukleat (Nurhayati, 2017).

##### a. Komponen DNA

Mononukleotida tersusun dari 3 komponen penyusun

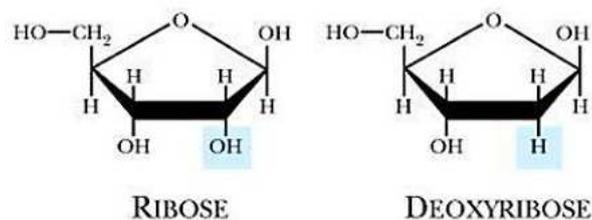
- 1) Basa Nitrogen, terdiri dari 2 kelompok yaitu basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri dari adenin (A) dan guanin(G). Basa pirimidin terdiri dari timin (T), urasil (U), dan sitokin (C). Struktur basa nitrogen penyusun asam nukleat dapat dilihat pada gambar 2.1



Sumber : Tribowo, 2005

Gambar 2.1 Basa Purin dan Pirimidin

- 2) Gula Pentosa atau gula 5 karbon, karena terdapat unsur C. Terdapat 2 jenis yaitu gula ribosa yang menyusun ribonukleotida (monomer RNA) dan gula 2-deoksiribosa yang menyusun monomer DNA.

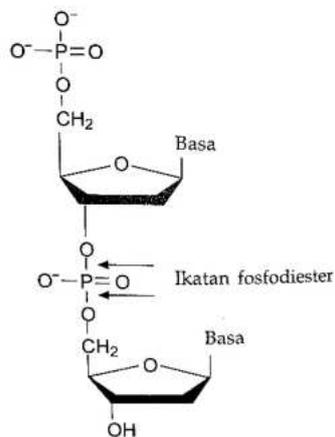


Sumber : Nurhayati, 2017

Gambar 2.2 Gula Ribosa dan Deoxyribosa

### 3) Gugus Phospat ( $\text{PO}_4$ )

Ikatan fosfodiester menghubungkan mononukleotida satu dengan yang lain. Ikatan ini terbentuk antara gugus  $\text{PO}_4$  pada atom C5 dari nukleotida satu dan gugus OH pada atom C3 dari nukleotida yang lain. Dua nukleotida yang terhubung dengan ikatan ini disebut dinukleotida. Polinukleotida terdiri dari lebih banyak nukleotida yang terhubung oleh banyak ikatan fosfodiester. Polinukleotida adalah asam nukleat yang terdiri dari DNA dan RNA.

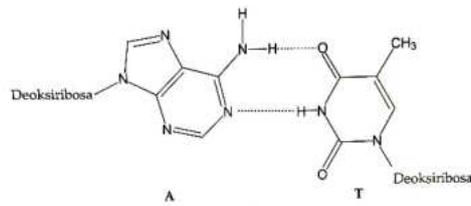


Sumber : Tribowo,2005

Gambar 2.3 Ikatan Fosfodiester Antar Nukleotida

### b. Struktur DNA

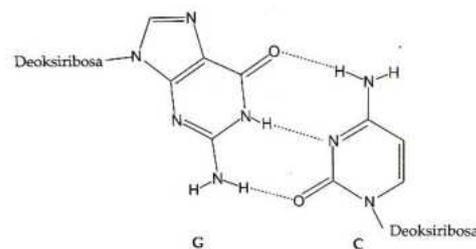
Mononukleotida, yang dapat dirangkai menjadi polinukleotida, terdiri dari satu gugus phospat, satu gula 2-deoksi-D-Ribosa, adenin, guanin, sitosin, dan timin, dan satu basa nitrogen. Struktur DNA berbentuk double helix atau double strand, di mana strand pertama dan strand kedua berpasangan atau komplementer. Selain itu, kedua strand memiliki ikatan hidrogen. Jika pada strand pertama, nukleotida membawa basa adenin maka akan berpasangan dengan nukleotida yang membawa basa timin pada strand kedua, sehingga terbentuk dua ikatan hidrogen antara kedua nukleotida, menghubungkan antara basa adenin dan timin (Nurhayati, 2017).



Sumber : Tribowo,2005

Gambar 2.4 Pasangan Basa Adenin dan Timin

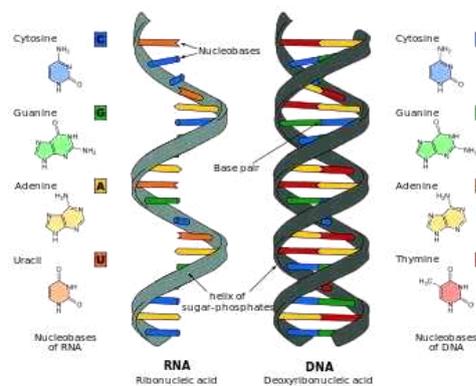
Apabila nukleotida pada strand pertama membawa basa sitosin maka akan berpasangan dengan nukleotida yang membawa basa guanin yang terdapat pada strand kedua. Kemudian antara kedua nukleotida tersebut akan terbentuk 3 ikatan hidrogen yang menghubungkan antara basa sitosin dengan guanin (Nurhayati, 2017).



Sumber : Tribowo, 2005

Gambar 2.5 Pasangan Basa Adenin dan Timin

Kedua strand bersifat komplementer dan keduanya dihubungkan oleh ikatan hidrogen yang bentuknya mirip seperti kereta api, namun tidak lurus dimana strand satu dengan strand yang lainnya hanya bersanding saja, tetapi kedua strand pada DNA terpilin ke kiri (Nurhayati, 2017).



Sumber : Nurhayati, 2017

Gambar 2.6 Representasi DNA Double Helix

## 2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

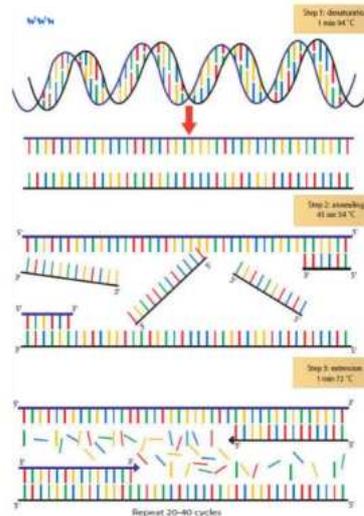
Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik molekuler yang memungkinkan penggandaan DNA secara *in vitro* dengan menggunakan enzim dan sepasang primer yang spesifik terhadap DNA target. Teknik ini memungkinkan segmen DNA tertentu digandakan menjadi jutaan kali dalam waktu yang relatif singkat, yang membuat PCR menjadi lebih mudah untuk teknik lain yang menggunakan DNA. PCR melibatkan tahap pemisahan utas DNA pada suhu tinggi, tahap penempelan primer, dan tahap pemanjangan primer menjadi utas baru DNA oleh enzim DNA polimerase. Mengingat proses ini melibatkan suhu tinggi, maka perkembangan dan aplikasi PCR sangat ditunjang oleh penemuan enzim DNA Polimerase yang bersifat tahan panas. DNA polimerase tahan panas umumnya diisolasi dari bakteri termofilik atau bakteri hipertermofilik. Enzim DNA polimerase yang umum digunakan adalah *taq polimerase* yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang tergolong Archaea termofilik. Saat ini berbagai jenis *taq polimerase* dengan variasi karakteristik tersedia secara komersial. Selain itu, teknik otomatisasi juga turut menopang perkembangan PCR (Artika, 2023).

Teknik PCR tergolong sederhana, tangguh, cepat, dan fleksibel. Saat ini PCR digunakan secara rutin pada berbagai laboratorium, seperti di perguruan tinggi, lembaga riset, industri farmasi, maupun laboratorium klinik. Karena bersifat sensitif, PCR sangat bermanfaat khususnya dalam menganalisis sampel dengan jumlah terbatas, seperti dalam bidang forensik, diagnosis penyakit, serta dalam riset biomolekuler (Artika, 2023).

### a. Prinsip Kerja PCR

Cara kerja PCR sangat mirip dengan mekanisme replikasi DNA di dalam sel. Pada awalnya, utas ganda DNA dipisahkan satu sama lain. Masing-masing utas tunggal yang terbentuk berfungsi sebagai template untuk mencetak utas baru. Proses ini diikuti oleh penempelan primer pada masing – masing utas tunggal, kemudian primer dipanjangkan oleh kerja enzim polimerase sehingga terbentuk utas baru DNA. Jumlah DNA utas ganda akan menjadi dua kali lipat untuk setiap siklus PCR. Setelah siklus di ulang – ulang maka akan terbentuk

fragmen DNA yang merupakan hasil amplifikasi daerah yang dibatasi oleh kedua primer. Dengan demikian, ukuran produk PCR (amplikon) bergantung pada posisi tempat masing – masing primer menempel (Artika, 2023).



Sumber : Nurhayati,2017

Gambar 2.7 Hibridisasi Primer pada DNA Template Pada Awal Siklus PCR

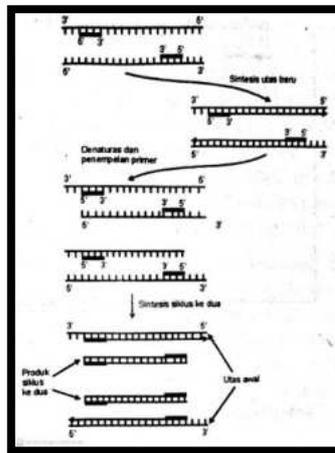
Pada dasarnya PCR menggandakan segmen khusus pada DNA target yaitu daerah yang dibatasi oleh kedua primer. Setiap molekul DNA dapat digunakan sebagai DNA target dengan syarat sequen pada bagian tepi dari segmen DNA yang akan diamplifikasi diketahui sehingga dapat dirancang primer yang secara spesifik menempel (berhibridisasi) pada daerah tersebut (Artika, 2023).

#### b. Tahapan Proses PCR

Tahapan PCR terdiri atas tiga tahap yaitu tahap denaturasi, tahap penempelan primer (annealing), dan tahap elongasi (pemanjangan primer) (Artika, 2023).

##### 1) Denaturasi

Tahap denaturasi ini memiliki tujuan yaitu memisahkan utas ganda DNA menjadi utas tunggal dengan menggunakan energi panas. Proses ini umumnya dilakukan pada suhu tinggi, yaitu 94° C – 96° C dan berlangsung selama 1 – 2 menit. Pemisahan ini menyebabkan DNA membentuk utas tunggal dan siap menjadi template bagi primer (Artika, 2023)



Sumber : Artika,2023

Gambar 2.8 Diagram Proses PCR

## 2) *Annealing*

Selanjutnya tahap penempelan primer (*annealing*) bertujuan untuk memberikan kondisi optimum bagi proses penempelan primer pada DNA template. Tahap ini umumnya dilakukan pada kisaran suhu 45 – 60°C. Primer menempel pada bagian DNA template yang memiliki urutan basa yang bersifat komplementer dengan urutan basa primer. Penempelan ini bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat dapat menyebabkan tidak terjadinya penempelan primer atau primer menempel secara tidak spesifik. Durasi tahap ini adalah sekitar 1-2 menit (Artika, 2023).

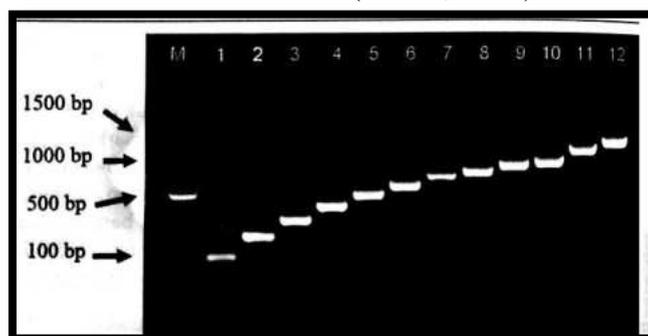
## 3) Ekstensi / Elongasi

Tahap pemanjangan atau ekstensi bertujuan untuk memberikan kondisi optimum bagi kerja enzim DNA polimerase dalam memanjangkan primer guna membentuk utas baru DNA. Tahap ini biasanya dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit. Suhu untuk proses ini bergantung pada jenis DNA polimerase yang digunakan. Siklus PCR di ulang – ulang hingga 25 – 30 siklus. Karena pada setiap siklus terjadi proses penggandaan DNA, maka DNA hasil amplifikasi akan bertambah secara logritmik seiring dengan bertambahnya siklus PCR. Namun demikian, fase logritmik hanya akan berlangsung hingga jumlah siklus tertentu dan setelah itu PCR akan mengalami fase plateau (Artika, 2023).

### 3. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan campuran makromolekul (DNA, RNA, dan Protein) berdasarkan ukuran dan muatan. Dengan menggunakan medan listrik makromolekul dapat dibuat bergerak dalam gel. Molekul yang berukuran lebih kecil bergerak lebih cepat dalam gel elektroforesis karena molekul kecil mudah melewati pori-pori gel (Artika, 2023)

Agarosa merupakan polimer polisakarida alami yang diekstraksi dari rumput laut. Agarosa merupakan polimer yang tersusun atas subunit agarobiosa (L – dan D-galaktosa). Serbuk agarosa jika dipanaskan dalam larutan buffer akan meleleh, kemudian setelah di dinginkan akan membentuk gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis. Elektroforesis gel agarosa merupakan metode yang paling efektif untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 100 – 25.000 pasang basa (basepair). Teknik ini merupakan teknik yang paling umum digunakan untuk memisahkan molekul DNA. Molekul DNA dan RNA mengandung gugus fosfat yang mengakibatkan DNA dan RNA bermuatan negatif pada larutan buffer dengan pH netral. Oleh karena itu, di bawah medan listrik molekul DNA akan bergerak menuju kutub positif. Laju pergerakan molekul DNA pada gel agarosa bergantung pada ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, tegangan/voltase yang digunakan, keberadaan ethidium bromide, jenis agarosa, dan buffer elektroforesis. Fragmen DNA dengan ukuran pendek bergerak lebih cepat. Dibandingkan fragmen DNA berukuran panjang sehingga melalui elektroforesis, fragmen DNA terpisah dan tersusun berdasarkan ukuran molekul (Artika, 2023).

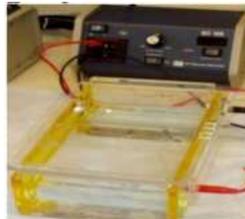


Sumber: Artika, 2017

Gambar 2.9 Pola Pergerakan Molekul DNA Pada Elektroforesis Gel Agarose

Setelah dipisahkan molekul DNA dapat divisualisasi di bawah sinar UV setelah terlebih dahulu diwarnai dengan pewarna (*dye*) yang sesuai, misalnya Ethidium Bromida. Elektroforesis gel agarosa juga dapat digunakan untuk memisahkan protein yang berukuran lebih dari 200 kDa. Penggunaan elektroforesis gel agarosa telah merevolusi proses pemisahan DNA yang sebelumnya menggunakan sentrifugasi gradien sukrosa untuk mendapatkan perkiraan ukuran molekul DNA. Secara umum, semakin tinggi konsentrasi agarosa semakin kecil pori gel yang terbentuk. Konsentrasi gel agarosa yang umum digunakan berkisar antara 0,5 – 2 % (Artika, 2023). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi proses migrasi DNA atau RNA, faktor – faktor ini menentukan hasil pemisahan :

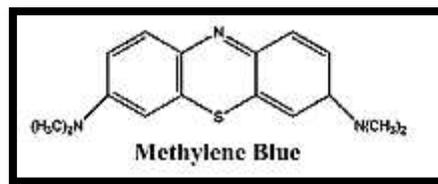
- a. Konsentrasi agarose : konsentrasi gel agarosa yang umum digunakan berkisar antara 0,5 – 2 %
- b. Ukuran Molekul DNA/RNA : ukuran dan struktur molekul DNA/RNA mempengaruhi mobilitas saat di elektroforesis.
- c. Voltase : DNA atau RNA merupakan molekul bermuatan negatif.
- d. Suhu : molekul DNA akan cepat terurai pada suhu tinggi dan akan kembali menyatu bila suhu mendingin (Fatchiyah, 2021).



Sumber : Nurhayati, 2017  
Gambar 2.10 Komponen Peralatan Elektroforesis

#### 4. Methylene Blue

Methylene Blue (*Methylthionine Chloride*) adalah senyawa kimia heterosiklik aromatik dengan rumus molekul  $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$  dan nama kimia [3,7-bis(*Dimethylamino-phenazathionium chloride Tetramethylthionine Chloride*)]. Methylene Blue (MB) merupakan pewarna thiazine kationik, berwarna biru tua pada saat teroksidasi dan tidak berwarna dalam bentuk tereduksi (Sarkar Phyllis, 2022).

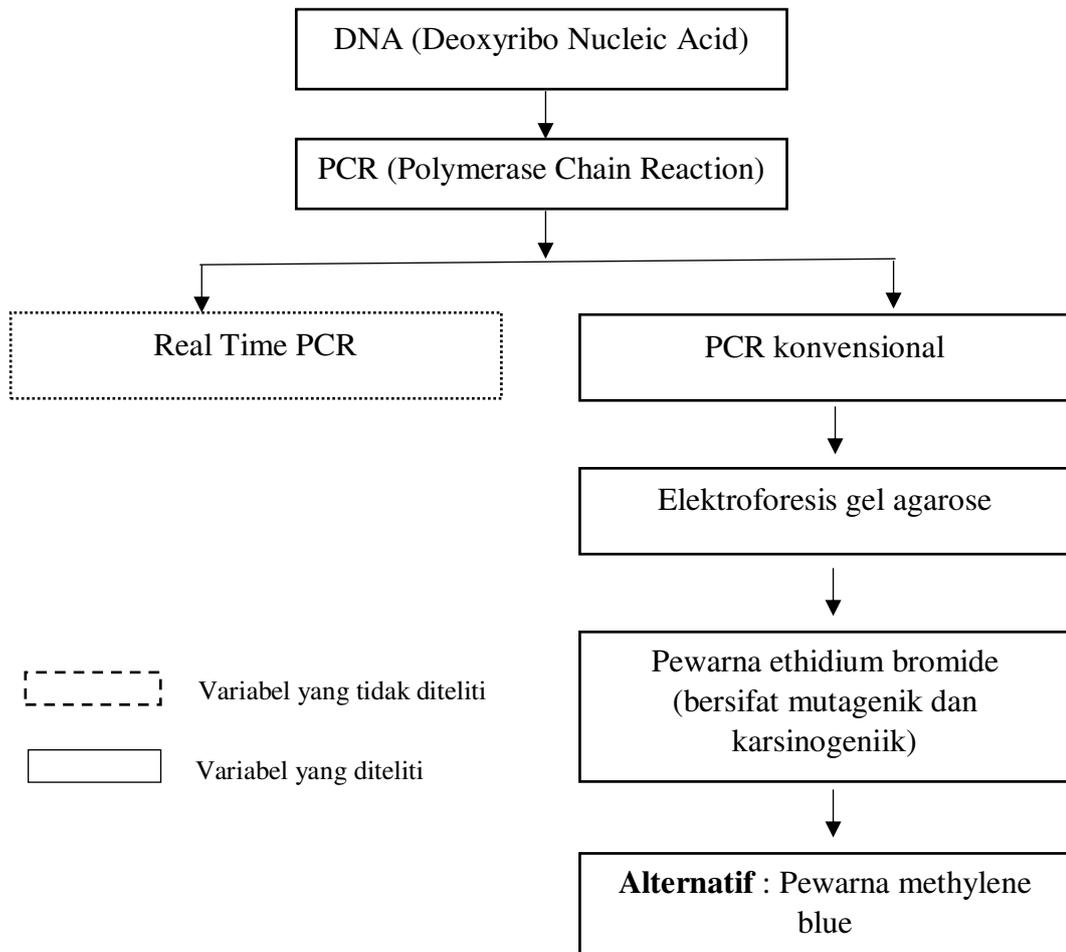


Sumber : Nafsi,2006

Gambar 2.11 Struktur Kimia Methylene Blue

Methylene Blue dimanfaatkan untuk pewarnaan histokimia, reagen biokimia dan dikembangkan untuk pengobatan berbagai penyakit seperti penyakit microbial, malaria, kanker dan keracunan sianida. Methylene blue berikatan dengan DNA melalui mode semi – interkalasi dan elektrostatik. Methylene blue sebagai intercalator memiliki struktur yang analog dengan Ethidium Bromida. Methylene Blue dapat berinteraksi dengan DNA melalui beberapa mekanisme yang berbeda tergantung pada sekuens nukleotida, kekuatan larutan ion, dan rasio konsentrasi Methylene Blue /DNA (Rohs, 2012).

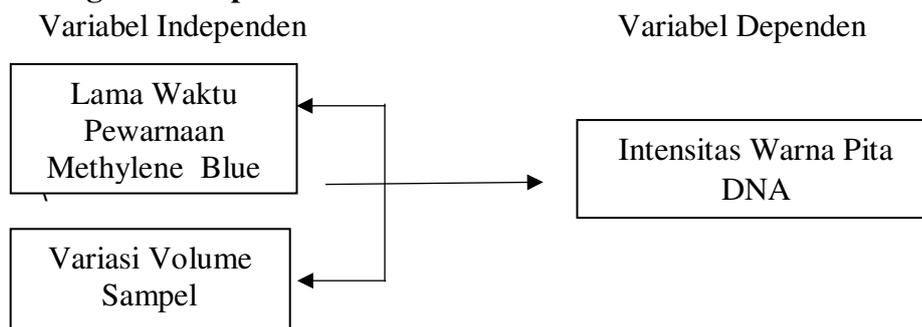
## B. Kerangka Teori



Sumber : (Artika, 2023)

Gambar 2.12 Kerangka Teori

## C. Kerangka Konsep



Gambar 2.13 Kerangka Konsep

**D. Hipotesis**

Ho : Pewarna Methylene Blue tidak sensitif sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis gel agarose.

Ha : Pewarna Methylene Blue sensitif sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis gel agarose.