

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

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 mengampifikasi 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 enzimatis. 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).

Uji kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometri dengan cara mengukur DNA murni hasil isolasi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, dimana pada panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang optimal DNA menyerap cahaya. Kualitas DNA juga dapat dilihat dari hasil elektroforesis gel agarose (Ainun dkk., 2018)

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam aliran medan listrik yang diberikan (Yahya dkk., 2016). 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 menghindari bahaya yang ditimbulkan dari pewarna EtBr. Salah satunya adalah penggunaan pewarna fluorescent yang memiliki kecepatan dan sensitivitas 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 methylene 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 memvisualisasikan pita DNA sehingga mengurangi terjadinya mutasi.

Penelitian mengenai penggunaan methylene 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 konsentersasi 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 konsentersasi 0,025% methylene blue dengan konsentersasi 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 mikroliter. Namun, pada penelitian tersebut belum dilakukan penelitian 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, selain itu penelitian ini juga diperkuat dengan melakukan uji kuantitas DNA dengan spektrofotometer sebelum melakukan proses elektroforesis.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis gel agarose?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Mengetahui sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis gel agarose.

2. Tujuan Khusus

- a. Menentukan intensitas warna pita DNA berdasarkan lama waktu pewarnaan 5,10,20 menit dengan menggunakan pewarna methylene blue.
- b. Menentukan intensitas warna pita DNA berdasarkan volume sampel 3, 6, 10 μ L.
- c. Mengetahui sensitivitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini memberikan manfaat teoritis terkait dengan alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis yaitu methylene blue sebagai alternatif pewarna pada proses elektroforesis gel agarose.

2. Manfaat Aplikatif

a. Bagi Institusi Pendidikan

Memberikan referensi terkait dengan methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose yang diharapkan nantinya dapat diaplikasikan dalam pembelajaran yang ada di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis terutama pada bidang biologi molekuler.

b. Bagi Peneliti

Peneliti dapat mengembangkan diri dan mengaplikasikan ilmu yang diperoleh dikampus terkait dengan bidang biologi molekuler dalam bentuk penelitian terkait methylene blue alternatif pewarna DNA pada

proses elektroforesis agarose dan sebagai syarat dalam menyelesaikan studi di Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

E. Ruang Lingkup Penelitian

Bidang keilmuan penelitian ini adalah bidang Biologi Molekuler. Jenis penelitian bersifat eksperimental, dengan desain penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas berupa lama waktu kontak pewarnaan methylene blue dan variasi volume sampel dan variabel terikat yaitu warna pita DNA. Rancangan penelitian ini dibuat dengan memberikan perlakuan berupa variasi volume sampel yang digunakan yaitu 3,6,10 μL dan waktu kontak pewarnaan (*staining time*) gel agarose dengan methylene blue selama 5,10,20 menit. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis pada bulan April– Mei 2024. Sampel penelitian yang digunakan adalah sampel kultur bakteri *Eschericia coli* yang diperoleh dari koleksi laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Analisa data yang digunakan adalah analisa statistik dengan menggunakan *One Way Annova*.