

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

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.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian Ini dilaksanakan pada bulan April – Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

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 yaitu :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Perlakuan

n : Pengulangan

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(6 -1) (n-1) \geq 15$$

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Independen : Lama Kontak Pewarnaan Methylene Blue	Lamanya perendaman gel agarose di dalam larutan Methylene e Blue yang paling optimal menghasilkan pita DNA hasil elektroforesis gel agarose	Stopwath	Observasi	Menit	Ordinal
	Variasi Volume Sampel	Banyaknya sampel DNA yang paling optimal menghasilkan pita DNA hasil elektroforesis gel agarose	Mikropipet	Observasi	Mikroliter (μL)	Rasio
2.	Dependen : Warna Pita DNA	Hasil elektroforesis gel agarose berupa pita DNA yang tampak berwarna biru setelah dilakukan pewarnaan menggunakan pewarna Methylene Blue.	Visualisasi dengan cahaya tampak (<i>Visible light</i>)	Gel Analyzer	Arbitrary Unit	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh adalah data primer. Data diperoleh dari visualisasi DNA hasil pewarnaan methylene blue. Dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah seperangkat peralatan elektroforesis gel agarose, spektrofotometer, mikropipet, white tip, UV transiluminator, wadah plastik, stopwatch, gelas kimia, labu erlenmeyer, neraca analitik, hotplate, pipet bulat, sarung tangan, labu ukur, gelas ukur, dan tisu.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

TIANamp Genomic DNA Kit, metyhlen blue, GelRed, produk PCR DNA, gel agarsoe, TAE, marker DNA, dan *aquadest*

c. Cara Kerja

1) Isoslasi DNA/ Ekstraksi DNA (TIANamp genomic DNA kit)

a) Preparasi Sampel

Sel : Buat menjadi suspense sel, sentrifuge 12.000 rpm selama 1 menit.

Buang supernatan dan resuspensikan pellet 200 mikroliter Buffer GA.

b) Tambahkan 20 ul proteinase K dan vortex hingga homogen.

c) Inkubasi pada suhu 56 C selama 30 menit

d) Ditambahkan 200 ul Buffer GB ke dalam sampel, vortex agar homogen lalu spin down dan inkubasi di 70° C selama 10 menit

e) Ditambahkan 200 ul ethanol 96% ke dalam sampel, vortex selama 15 detik lalu spin down.

f) Pipet dan masukkan campuran tersebut ke dalam TIANamp spin colom CB3. Lalu sentrifuge 30 detik, 12.000 rpm. Buang cairan yang ada di dalam kolom microtube dan tempatkan spin colom ke dalam collection tube.

g) Ditambahkan 500 ul Buffer GD ke dalam spin colom. Lalu sentrifuge 30 detik, 12.000 rpm. Buang cairan yang ada di dalam kolom microtube dan tempatkan spin colom ke dalam collection tube.

h) Ditambahkan 700 uL Buffer PW ke dalam spin colom. Lalu sentrifuge 30 detik, 12.000 rpm. Buang cairan yang ada di dalam kolom microtube dan tempatkan spin colom ke dalam collection tube.

i) Ditambahkan 500 uL Buffer PW ke dalam spin colom. Lalu sentrifuge 30 detik, 12.000 rpm. Buang cairan yang ada di dalam kolom microtube dan tempatkan spin colom ke dalam collection tube.

j) Sentrifuge selama 2 menit, dengan kecepatan 12.000 rpm untuk mengeringkan membrane.

- k) Tempatkan kolom Cb3 ke dalam tube 1,5 ml yang baru. Lalu tambahkan 50 – 200 uL Buffer TE ke tengah membrane
- l) Inkubasi di suhu ruang selama 5 menit. Lalu sentrifuge selama 2 menit, 12.000 rpm
- m) Total DNA, lakukan identifikasi molekuler atau simpan pada suhu -20° C hingga -80°C.

2) Uji Kuantitas DNA

Penentuan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer UV, DNA hasil isolasi diukur pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan untuk protein diukur pada panjang gelombang 280 nm. Untuk mengetahui konsentersasi DNA dihitung dengan rumus :

Konsentersasi DNA : $\text{Abs } 260 \times 50 \times 250(\text{faktor pengenceran})$

(Wasdili dkk., 2018).

3) Pembuatan Mastermix PCR

- a) Siapkan semua bahan yang dibutuhkan dan kondisikan pada suhu ruang, kecuali enzim *taq polymerase*
- b) Buat formula mastermix.
- c) Masukkan semua komponen 16 µL mastermix ke dalam PCR tube kecuali DNA template, lalu vortex sedang agar komponen homogen.
- d) Masukkan 4 µL DNA template nuclease free water ke dalam PCR tube yang sudah berisi master mix, lalu spin down untuk menurunkan semua reagent di tube.

4) Running PCR

- a) Hidupkan alat PCR lalu setting parameter running PCR sebagai berikut

Tabel 3.2 Siklus PCR

Step Siklus	Suhu (°C)	Waktu (min/sec)
Inisial Denaturasi	94° C	3 menit
Denaturasi	94° C	30 menit
Annealing	57 ° C	30 menit
Extensi	72 ° C	1 menit
Pengulangan	39 Kali	
Final extensi	72 ° C	5 menit
Inkubasi	4° C	Jika dibutuhkan

- b) Analisa produk PCR dengan proses elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%
- 5) Pembuatan Gel Agarose Konsentrasi 1,5%
- a) Buat 250 ml larutan Buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 5 mL buffer TAE 50 x kedalam 245 ml aquadest.
 - b) Buat gel agarose 1,5 % dengan cara menimbang 0,375g gel agarose kemudian dilarutkan dalam 25 mL buffer TAE 1x dan didihkan hingga larut sempurna.
 - c) Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki dengan posisi hampir menyentuh dasar baki.
 - d) Periksa suhu larutan agarose dengan cara menempelkan erlenmeyer ke tangan, jika suhunya sudah turun hingga sekitar 60° C, tuangkan larutan agarose ke dalam baki elektroforesis, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
 - e) Ambil sisir dengan hati – hati
- 6) Menjalankan Elektroforesis
- a) Masukkan baki yang telah berisi gel agarose ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan sisa larutan buffer TAE 1x. (Pastikan bahwa gel agarose terendam seluruhnya dalam TAE)
 - b) Dipipet sebanyak 6 µL DNA sampel, 6 µL marker DNA yang digunakan adalah DNA hasil isolasi dari bakteri *Eschericia coli*.
 - c) Hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambungkan ke kutub negatif berada di dekat sumuran, sedangkan kabel yang tersambung ke kutub positif berada jauh dari sumuran, jika tidak demikian ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya.
 - d) Nyalakan sumber arus, aturlah voltase dan waktu running elektroforesis hingga diperoleh angka 100 volt dan 60 menit.
 - e) Jalankan elektroforesis (lakukan running) dengan cara menekan tombol *run* pada sumber arus.

- f) Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai dengan adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus listrik dan angkatlah baki dari tangki elektroforesis.

7) Persiapan Larutan Pewarnaan

- a) Dibuat sebanyak 100 ml larutan stok methylene blue dengan konsentrasi 1%, dengan cara menimbang 1 gram serbuk methylene blue kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest, lalu disaring. Setelah itu dibuat konsentrasi methylene blue sebesar 0,025%
- b) Pembuatan 100 ml larutan methylene blue 0,025% dilakukan dengan memipet 2,5 ml larutan stok methylene blue 1% ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian menambahkan aquadest hingga tanda batas, kemudian homogenkan.

8) Pewarnaan DNA

Gel agarose yang telah ditambahkan GelRed, setelah proses elektroforesis selesai, di visualisasikan dibawah sinar UV. Gel ini digunakan sebagai perbandingan untuk gel agarose yang diwarnai dengan methylene blue. Letakkan gel agarose yang telah diwarnai dengan GelRed di atas transilluminator UV. Nyalakan transilluminator UV, amati pita DNA yang divisualisasikan.

- a) Merendam gel agarose dengan konsentrasi methylene Blue 0,025 %. Waktu perendaman divariasikan (10,15, 20 menit). Kemudian dilakukan *deep destaining* menggunakan aquadest selama 30 menit. Hasil pewarnaan menggunakan methylene blue diamati dengan menggunakan cahaya tampak (visible light).

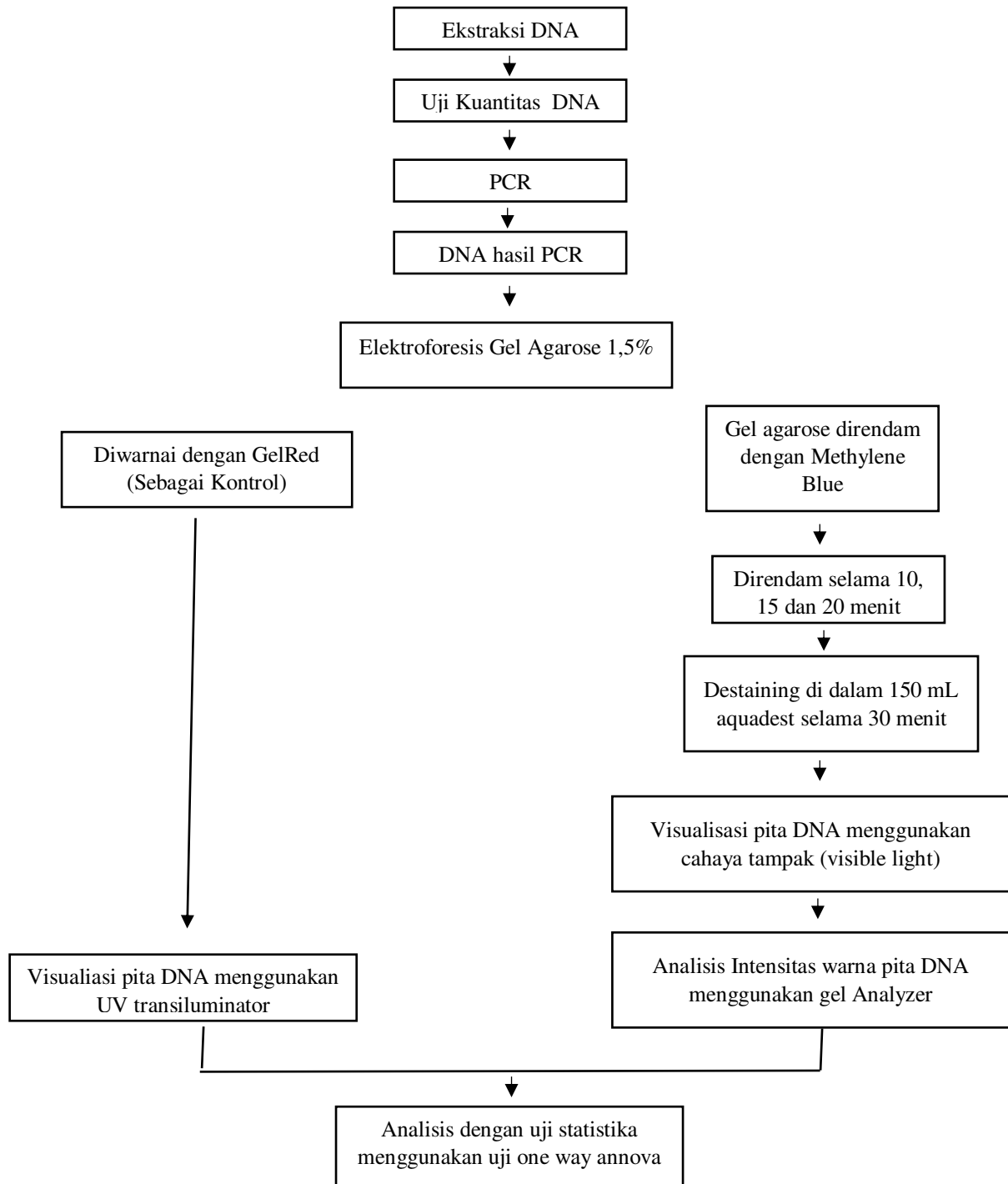
9) Visualisasi DNA

Intensitas warna pita DNA divisualisasikan dengan menggunakan software gel analyzer 23.1.1. Cara menggunakan gel analyzer :

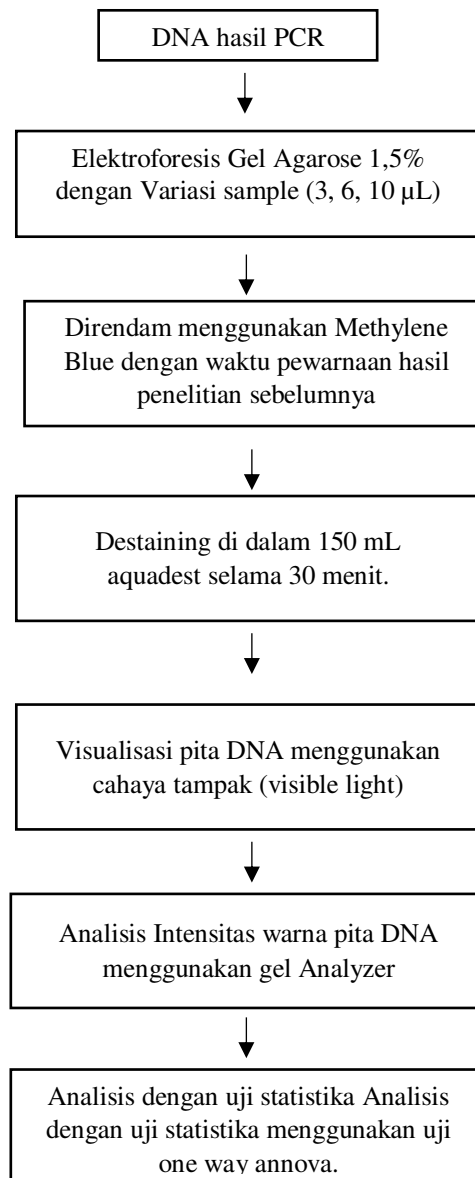
- a) Buka software gel analyzer 23.1.1 yang sudah di unduh pada PC.
- b) Upload foto gel agarose yang sudah di visualisaikan baik menggunakan UV transilluminator atau *visible light*.
- c) Tandai pita DNA yang ingin kita ketahui intensitas warnanya.
- d) Data terkait intensitas warna, ukuran, dll akan muncul pada software.

3. Alur Kerja Penelitian

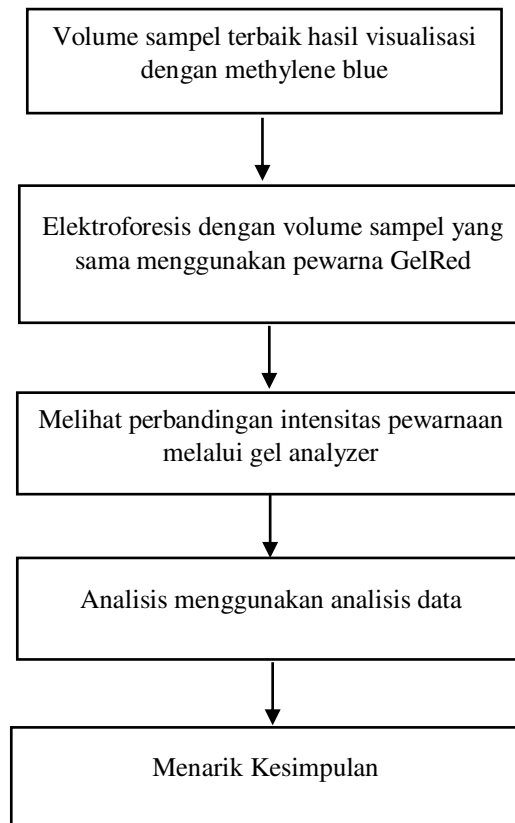
A. Alur kerja pewarnaan



B. Alur kerja variasi volume sampel



C. Alur kerja uji sensitivitas



Gambar 3.1 Alur Kerja Penelitian

F. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Setelah data didapatkan kemudian data diolah dengan menggunakan program komputerisasi dengan langkah sebagai berikut :

a. Entry Data

Tahap di mana peneliti memasukkan data yang diperoleh berupa hasil visualisasi DNA pada proses elektroforesis agarose dengan menggunakan Methylene Blue

b. Coding

Tahap di mana peneliti memberikan kode pada atribut penelitian

c. Prosesing

Tahap dimana peneliti melakukan proses pengetikan data dari *checklist* ke program komputer agar dapat dianalisis.

d. Cleaning

Tahap di mana peneliti melakukan pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan, untuk melihat apakah ada kesalahan saat memasukkan data.

2. Analisis Data

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 Anova dilanjutkan dengan uji Post hoc dengan menggunakan aplikasi Statistical Program For Social Science (SPSS).

G. Etika Clearance

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik dengan nomer etik No.185/KEPK-TJK/II/2024 penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dikumpulkan dalam penanganan limbah. Limbah berupa sampel bakteri, pewarna methylene blue, gel agarose akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan.