

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hepatitis B adalah salah satu dari masalah kesehatan yang paling umum dan serius. Menurut WHO, pada tahun 2022 diperkirakan sebanyak 254 juta orang mengidap Hepatitis B kronis dengan kasus 1,2 juta infeksi baru setiap tahunnya. Pada tahun 2022 juga sekitar 1,1 juta orang meninggal dunia karena hepatitis B dengan sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler (kanker hati primer) menjadi penyebab utamanya (WHO, 2024). Prevalensi yang didasarkan pada diagnosis dokter berdasarkan laporan RISKESDAS Nasional pada tahun 2018, di Indonesia terdapat sekitar 1.017.290 jiwa yang didiagnosis hepatitis (Kemenkes RI 2018). Provinsi Lampung sendiri terdapat sebanyak 31.462 orang terdiagnosis hepatitis. Kota Bandar Lampung terdapat sebanyak 3.878 orang terdiagnosis hepatitis pada tahun yang sama (Kemenkes RI 2018).

Diagnosis hepatitis B dapat dilakukan melalui berbagai tes, termasuk tes serologis, biokimia, dan molekuler (Sanantang dkk., 2021). Berbagai metode pemeriksaan laboratorium dengan teknologi terkini dikembangkan untuk memperoleh data kesehatan yang akurat, salah satunya metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) (Dewantoro dkk., 2020). PCR merupakan reaksi amplifikasi DNA secara *in vitro* yang memperbanyak DNA menggunakan enzim DNA polimerase dan juga dengan penggunaan primer yang spesifik terhadap patogen tertentu, menjadikan PCR memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi (Maksum dkk., 2019).

Tahap awal dalam proses PCR adalah isolasi DNA, yang bertujuan memisahkan DNA dari unsur sel lain seperti protein, membran sel, dan unsur-unsur sel lainnya. Proses ini menggunakan kombinasi metode fisika, kimia, dan enzimatis untuk melisiskan dinding sel dan memurnikan DNA. Setelah isolasi, DNA yang telah dipisahkan digunakan dalam tahap amplifikasi. Pada tahap ini, DNA diperbanyak melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan bantuan enzim DNA polimerase.

Proses ini menghasilkan banyak salinan DNA. Setelah amplifikasi, langkah selanjutnya adalah analisis kualitas dan kuantitas DNA menggunakan metode elektroforesis. Teknik elektroforesis berperan penting di visualisasi fragmen DNA berdasarkan ukuran dan kualitasnya, sehingga mendukung identifikasi dan validasi hasil isolasi serta amplifikasi DNA (Wasdili, 2018).

Elektroforesis adalah suatu metode untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukurannya. Penelitian oleh Fatmawali (2014) menunjukkan bahwa elektroforesis berhasil digunakan untuk menganalisis mutasi gen protein X dari virus hepatitis B (HBV) pada pasien hepatitis akut, dengan 5 dari 10 sampel DNA HBV yang diuji berhasil diidentifikasi ukuran nukleotida gen Xnya. Pada Akhir elektroforesis, DNA yang telah terpisah berdasarkan ukurannya akan terlihat sebagai pita-pita pada gel. Visualisasi pita-pita ini memerlukan pewarna khusus seperti etidium bromida (EtBr) yang dapat berinterkalasi dengan DNA dan menghasilkan fluoresensi saat diamati dibawah sinar UV (Intarapanich *et al.*, 2015).

Etidium bromida (EtBr) bersifat mutagenik, yang berarti dapat berinterkalasi oleh DNA utas ganda pada manusia. Interkalasi tersebut mengakibatkan adanya gangguan proses biologis dari suatu sel, seperti saat replikasi dan transkripsi DNA (Nataprawira, 2022). Untuk melihat DNA yang telah diwarnai dengan EtBr juga membutuhkan sinar UV, dimana sinar UV dengan panjang gelombang pendek bisa berbahaya, selain itu, limbah yang dihasilkan dari gel yang diwarnai dengan EtBr merupakan limbah berbahaya yang dibuang dengan peralatan khusus (Sigmon, 1996).

Saat ini sudah banyak pengganti etidium bromida (EtBr) yang digunakan untuk memvisualisasikan hasil elektroforesis DNA yaitu etil violet, acridine orange, crystal violet, SYBR safe, SYBR green I, GelRed, BlueView, DAPI dan juga metylene blue. Penggunaan GelRed, DAPI, dan SYBR safe I mempunyai sensitivitas yang hampir sama dengan penggunaan etidium bromida, namun biaya yang dikeluarkan lebih banyak jika dibandingkan dengan penggunaan etidium bromida (Merdekawati dkk., 2021).

Alternatif pewarna DNA yang aman, mudah ditemukan dan juga dengan harga yang ekonomis yaitu methylene blue. Methylene blue adalah senyawa trisiklik heteroaromatik yang mampu berikatan dengan DNA (Merdekawati dkk., 2021). Methylene blue mewarnai DNA dengan proses yang sama ketika etidium bromida berikatan dengan DNA, yaitu berinterkalasi. Toksisitasnya yang rendah, tidak karsinogenik, dapat diamati secara langsung tanpa menggunakan sinar UV, juga harganya yang relatif murah menjadi keunggulan dari penggunaan methylene blue (Nafisi dkk., 2006).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Winarti (2017) dengan judul optimalisasi penggunaan methylene blue sebagai pengganti etidium bromida pada DNA hasil elektroforesis agarosa, didapat hasil optimal methylene blue yaitu pada konsentrasi 0,0125% dengan waktu kontak selama 25 menit pada agarose 2% dengan elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 150 volt. Merdekawati dkk (2021) juga melakukan penelitian lanjutan mengenai kondisi optimum methylene blue sebagai pewarna alternatif pada sampel DNA SARS-CoV-2 dalam gel agarosa dan didapat hasil yang menunjukkan pita DNA 100 bp dan 250 bp tervisualisasi menggunakan konsentrasi 0,025% methylene blue, konsentrasi 1,5% agarose, waktu pewarnaan selama 20 menit dan waktu penghilangan pewarnaan 30 menit. Proses elektroforesis berjalan dengan tegangan 100 volt selama 60 menit dan volume sampel yang ditambahkan yaitu 10 μ L.

Penelitian lanjutan terkait sensitivitas methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose dilakukan oleh Wulandari (2024) sampel yang digunakan adalah kultur bakteri *Eschericia coli* dan didapatkan hasil waktu pewarnaan methylene blue yang optimal untuk pewarnaan DNA hasil elektroforesis gel agarose adalah 15 menit dengan volume sampel 3 μ L dengan tegangan 100 volt selama 60 menit.

Berdasarkan penelitian sebelumnya terkait dengan sensitifitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose dengan sampel kultur bakteri *Eschericia coli*, maka perbedaan atau pembaharuan yang akan dilakukan pada penelitian ini yaitu

menggunakan sampel berupa plasma pada pasien positif hepatitis dengan memvariasikan volume sampel yaitu 2, 4, 6 dan 8 μL dan memvariasikan lama kontak pewarnaan selama 10, 15, 20 dan 25 menit dengan tegangan yang digunakan sebesar 100 volt selama 60 menit. Sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terkait dengan sensitifitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pasien positif hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana sensitivitas methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pada pasien positif Hepatitis B pada proses elektroforesis agarose?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Mengetahui sensitivitas methylene blue sebagai pewarna DNA pasien positif Hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.

2. Tujuan Khusus

- a. Menentukan intensitas warna pita DNA berdasarkan lama pewarnaan 10, 15, 20 dan 25 menit dengan menggunakan pewarna methylene blue menggunakan *software gel analyzer 23.1.1*.
- b. Menentukan intensitas warna pada pita DNA berdasarkan volume sampel 2, 4, 6 dan 8 μL menggunakan *software gel analyzer 23.1.1*.
- c. Mengetahui sensitivitas methylene blue sebagai pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose yang divisualisasikan dengan cahaya tampak (*Visible light*).

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini memberikan manfaat teoritis terkait dengan alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis yaitu methylene blue sebagai pewarna DNA pasien positif hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.

2. Manfaat Aplikatif

a. Bagi Institusi Pendidikan

Menambah referensi terkait dengan methylene blue sebagai pewarna DNA pada proses elektroforesis agarose yang diharapkan nantinya dapat diaplikasikan dalam pembelajaran praktikum pada bidang Biologi Molekuler yang ada di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

b. Bagi Peneliti

Peneliti mampu mengembangkan diri dan mengaplikasikan ilmu yang didapat di kampus pada bidang biologi molekuler dan hasil penelitian dapat menambah wawasan, pengetahuan dan pengalaman dalam melakukan penelitian tentang sensitivitas methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pasien positif Hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.

E. Ruang Lingkup Penelitian

Bidang keilmuan penelitian ini adalah bidang Biologi Molekuler. Jenis penelitian ini bersifat eksperimental, dengan desain penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas berupa lama waktu kontak methylene blue dan variasi volume sampel. Variabel terikat yaitu warna pita HBV DNA. Sampel penelitian yang dipakai adalah plasma pasien positif hepatitis B yang diperoleh dari RS Pertamina Bintang Amin. Subyek penelitian adalah methylene blue yang digunakan sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis. Rancangan penelitian ini dibuat dengan perlakuan variasi volume sampel yang dipakai yaitu 2, 4, 6 dan 8 μL dan waktu kontak pewarnaan (*staining time*) gel agarose dengan methylene blue selama 10, 15, 20 dan 25 menit. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis pada bulan Mei-Juni 2025. Analisis data dilakukan secara univariat dan bivariat. Analisa univariat yang dilakukan adalah uji normalitas shapiro wilk dan analisa bivariat yang dilakukan adalah uji non parametrik Kruskal-Wallis.