

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**Pengembangan Biosensor DNA Secara Elektrokimia
Tanpa Indikator Eksternal untuk Deteksi Bakteri Patogen
dalam Sampel Darah**

Tahun ke-1 dari rencana 2 tahun

Ketua Peneliti

Dr. Yeni Wahyuni Hartati (NIDN: 0024097101)

Anggota Peneliti

Dr. Shabarni Gaffar, M.Si. (NIDN: 0025047105)

Santhy Wyantuti, M.Si (NIDN: 0026107301)

**UNIVERSITAS PADJADJARAN
NOVEMBER, 2012**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sampai saat ini demam tifoid masih menjadi masalah kesehatan global terutama di negara-negara berkembang, khususnya di Asia Tenggara, Afrika, dan Amerika Latin. Di seluruh dunia, diperkirakan sebanyak 17 juta orang per tahun terinfeksi penyakit demam tifoid (Hatta & Smits, 2007). Hal ini disebabkan penyebaran demam tifoid berkaitan erat dengan urbanisasi, kepadatan penduduk, kesehatan lingkungan, sumber air dan sanitasi yang buruk, serta standar kesehatan industri pengolahan makanan yang masih rendah (Prasetyo & Ismoedijanto, 2011).

Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Bakteri *S.typhi* berbentuk batang, tidak berspora, mempunyai flagel, pada pewarnaan gram bersifat gram negatif, dan memiliki ukuran 2-4 mikrometer x 0,5-0,8 mikrometer (Wanenoer, 2011).

Diagnosis demam tifoid dapat dilakukan dengan isolasi atau biakan bakteri. Hal ini berdasarkan ditemukannya bakteri *Salmonella typhi* dalam biakan dari darah, urin, feses, sumsum tulang, atau dari cairan duodenum. Kendala dari metode ini yaitu sensitivitas yang rendah, waktu yang dibutuhkan relatif lama (5-7 hari) sehingga tidak efektif dan tidak tepat untuk dipakai sebagai metode diagnosis baku dalam pelayanan penderita (Prasetyo & Ismoedijanto, 2011). Dengan demikian diperlukan metode laboratorium yang cepat dan spesifik untuk diagnosis demam tifoid sehingga penanganan penyakit dapat cepat dilakukan dan efektif (Edelman & Levine, 1986).

Metode diagnosis demam tifoid yang lain yaitu uji serologis untuk deteksi antibodi *Salmonella typhi* yang dilakukan dengan berbagai teknik seperti uji Widal; tes TUBEX[®]; dan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Kelemahan metode ini adalah sulitnya mencari antibodi yang bereaksi spesifik dengan antigen *Salmonella typhi* (Hendarta, 2011).

Metode diagnosis demam tifoid yang lainnya yaitu berdasarkan deteksi DNA bakteri *Salmonella typhi* dalam darah dengan teknik amplifikasi DNA yaitu *polymerase chain reaction* (PCR). Deteksi produk amplifikasi dapat dilakukan dengan visualisasi menggunakan elektroforesis agarosa (Sulistyaningsih, 2007). Pada elektroforesis gel agarosa digunakan etidium bromida yang bersifat karsinogenik. Untuk mengurangi penggunaan zat beracun seperti etidium bromida maka dilakukan pengembangan metode karakterisasi amplicon PCR menggunakan biosensor DNA. Biosensor DNA berdasarkan proses hibridisasi asam nukleat berkembang pesat ke arah pengujian yang cepat terhadap penyakit infeksi maupun genetik. Transduser elektrokimia sering digunakan untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi DNA, karena sensitivitasnya, dimensinya yang kecil dan biayanya yang tidak mahal. Selain itu, respon elektrokimia dapat secara langsung dikarakterisasi dengan sinyal elektrokimia (Wang *et al.*, 1997). Dengan demikian karakterisasi amplicon PCR secara biosensor DNA diharapkan menjadi metode deteksi yang spesifik dan cepat.

Pada penelitian sebelumnya teknologi PCR–biosensor voltametri telah digunakan untuk mendeteksi urutan spesifik *S.typhi* pada gen *carA* (Nurmalasari, 2011). Hasil penelitian tersebut menyimpulkan bahwa primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *carA S.typhi* hanya berhasil digunakan untuk mengamplifikasi gen *carA* dari kultur bakteri dengan dihasilkannya satu pita. Namun, tidak dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *carA* dari sampel darah karena diperoleh banyak pita yang berarti amplicon PCR tidak spesifik. Selain itu, pada deteksi dengan biosensor voltametri, hasil hibridisasi DNA pada sampel darah memiliki arus puncak yang jauh berbeda dengan bakteri *S. typhi* sebagai kontrol positif.

Untuk mengatasi produk PCR yang tidak spesifik maka dilakukan pengembangan metode menjadi *nested* PCR. *Nested* PCR terdiri dari dua siklus PCR dan menggunakan dua pasang primer. Metode *nested* PCR memiliki spesifitas yang lebih tinggi dibandingkan PCR biasa karena digunakan dua pasang primer, sepasang primer sebagai primer universal dan sepasang primer

sebagai batas awal dan akhir urutan DNA spesifik yang akan diamplifikasi. Sehingga dihasilkan produk amplifikasi yang spesifik dan produk amplifikasi non spesifik dapat diminimalisir.

Gen *flagellin* merupakan target analisis pada penelitian ini karena di dalam gen *flagellin* terhadap antigen H. Antigen H merupakan antigen yang lestari pada *S.typhi*.

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengembangan pendeteksian *S.typhi* pada gen *flagellin* dengan metode *nested* PCR (Song *et al.*, 1993) dan dikarakterisasi secara biosensor voltammetri.

1.2 Identifikasi Masalah

Dari uraian latar belakang di atas, permasalahan yang akan diteliti adalah bagaimana kinerja metode *nested* PCR–biosensor voltammetri untuk mendeteksi gen *flagellin S. typhi*.

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud penelitian ini yaitu untuk mengembangkan dan mempelajari teknik biosensor voltammetri untuk diagnosis penyakit demam tifoid, sedangkan tujuan penelitian ini adalah mendeteksi gen *flagellin S.typhi* menggunakan teknik *nested* PCR- biosensor voltammetri.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai pengembangan teknik elektroanalisis dalam mendeteksi suatu molekul DNA yang dapat digunakan dalam diagnosis klinis untuk analisis di bidang kesehatan.

1.5 Metode Penelitian

Tahapan kerja yang dilakukan adalah :

1. Penelusuran kepustakaan dari literatur, internet, dan jurnal.
2. Pembuatan larutan-larutan.

3. Lisis *S. typhi*.
4. Amplifikasi fragmen gen *flagellin S. typhi* dengan teknik *nested* PCR.
5. Desain urutan *probe*.
6. Pengujian respon hibridisasi *probe*-DNA target sintesis dan *probe*-DNA amplikon gen *flagellin S. typhi* secara voltametri pulsa diferensial.
7. Perhitungan parameter analitik.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan November 2011 sampai dengan Juli 2012 di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA UNPAD Jatinangor dan Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA UNPAD Jl. Singaperbangsa No. 2 Bandung.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi adalah bakteri berbentuk batang, tidak berspora dan mempunyai flagel, pada pewarnaan gram bersifat gram negatif, dan memiliki ukuran 2 - 4 μm x 0,5 – 0,8 μm (Wanenoer, 2011).



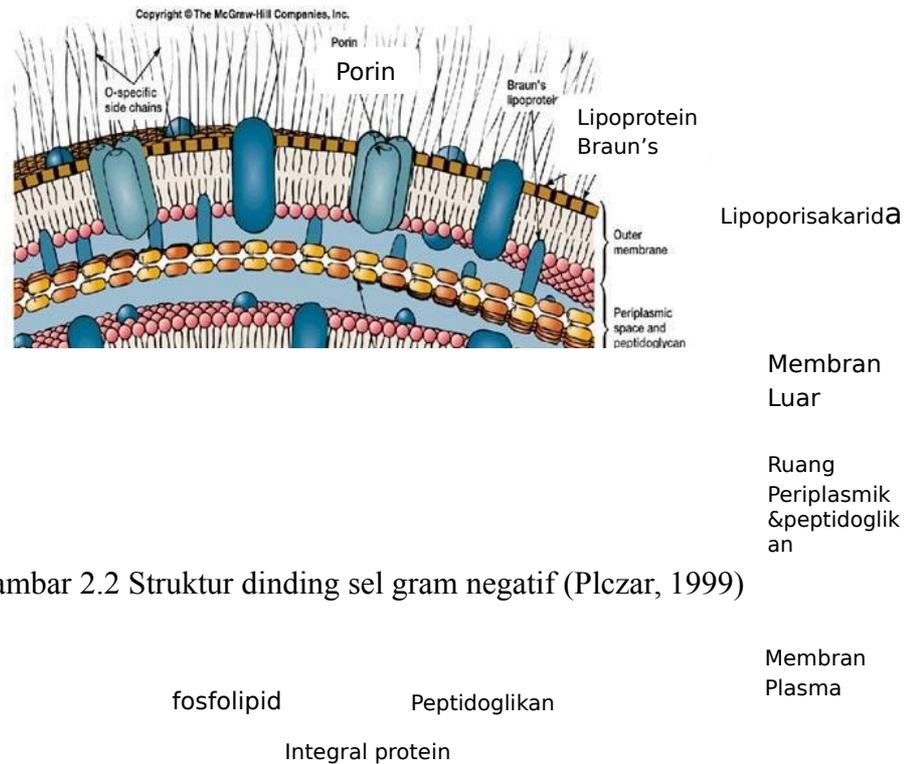
Gambar 2.1 Bakteri *Salmonella typhi* (Anitei, 2006).

Struktur antigen dari *Salmonella typhi* terdiri atas (Riezakirah, 2011) :

- Antigen O (somatik) badan bakteri yang terdiri dari kompleks lipoprotein polisakarida
- Antigen H (flagella) yang terdiri atas protein
- Antigen Vi (*virulence*) yang terdiri atas polisakarida atau polipeptida

Adapun taksonomi dari *S. typhi* adalah sebagai berikut (Todar, 2011) :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Gamma proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>



Gambar 2.2 Struktur dinding sel gram negatif (Plczar, 1999)

2.2 Penyakit Demam Tifoid dan Metode Deteksinya

Demam tifoid merupakan infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Demam tifoid masih menjadi masalah kesehatan penting di negara berkembang (Pang, 1992). Berbagai metode diagnosis demam tifoid masih terus dikembangkan untuk mencari metode yang cepat, mudah dilakukan dan murah biayanya dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Hal ini penting untuk penegakan diagnosis sedini mungkin dimana pemberian terapi yang sesuai secara dini dapat menangani demam tifoid dengan cepat, menghindari terjadinya komplikasi yang berat dan kematian serta memungkinkan usaha kontrol penyebaran penyakit melalui identifikasi karier (Pawitro dkk., 2002).

Pemeriksaan laboratorium untuk diagnosis demam tifoid dibagi dalam empat kelompok, yaitu: (1) pemeriksaan darah tepi; (2) pemeriksaan bakteriologis dengan isolasi dan biakan bakteri; (3) uji serologis; dan (4) pemeriksaan bakteri secara molekuler (Tumbelaka, 2005).

a. Pemeriksaan Darah Tepi

Gejala yang biasa ditimbulkan pada penderita demam tifoid adalah anemia; jumlah leukosit normal, menurun atau meningkat; trombositopenia dan limfositosis relatif, terutama pada fase lanjut (Hoffman, 1991). Penelitian oleh beberapa ilmuwan mendapatkan bahwa jumlah dan jenis leukosit serta laju endap darah tidak mempunyai nilai spesifisitas cukup tinggi untuk dipakai dalam membedakan antara penderita demam tifoid atau bukan demam tifoid. Akan tetapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis demam tifoid (Pawitro dkk., 2002).

b. Identifikasi Melalui Isolasi/Biakan

Diagnosis ini berdasarkan ditemukannya bakteri *Salmonella typhi* dalam biakan dari darah, urin, feses, sumsum tulang, atau dari cairan duodenum. Hasil biakan yang positif memastikan demam tifoid, akan tetapi hasil negatif tidak menghilangkan dugaan demam tifoid. Kegagalan dalam isolasi/biakan dapat disebabkan oleh keterbatasan media yang digunakan, jumlah bakteri yang sangat minim dalam darah, volume spesimen yang tidak mencukupi, dan waktu pengambilan spesimen yang tidak tepat. Kendala dari metode ini yaitu sensitivitas yang rendah, lamanya waktu yang dibutuhkan (5-7 hari) sehingga tidak praktis dan tidak tepat untuk dipakai sebagai metode diagnosis baku dalam pelayanan penderita (Prasetyo & Ismoedijanto, 2011).

c. Identifikasi Bakteri Melalui Uji Serologis

Uji serologis digunakan untuk diagnosis demam tifoid dengan mendeteksi antibodi spesifik terhadap komponen antigen *S. typhi*. Volume darah yang diperlukan untuk uji serologis ini adalah 1-3 mL yang diinokulasikan ke dalam tabung tanpa antikoagulan. Beberapa uji serologis yang dapat digunakan pada demam tifoid ini meliputi: uji Widal; tes TUBEX[®]; metode *enzyme immunoassay* (EIA), metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan pemeriksaan dipstik (Rachmat, 2011).

Beberapa uji serologis yang dapat digunakan untuk diagnosis demam tifoid meliputi (Marhamah, 2009) :

- 1) Uji widal, pemeriksaan reaksi antara antibodi aglutinin dalam serum penderita yang telah mengalami pengenceran berbeda-beda terhadap antigen somatik (O) dan flagela (H) yang ditambahkan dalam jumlah sama sehingga terjadi aglutinasi.
- 2) Tes TUBEX[®], merupakan tes aglutinasi kompetitif semi kuantitatif yang sederhana dan cepat, menggunakan partikel berwarna untuk meningkatkan sensitivitas.
- 3) Metode *enzyme immunoassay* (EIA), uji serologi ini didasarkan pada metode untuk melacak antibodi spesifik IgM dan IgG terhadap antigen OMP 50 kD *S. typhi*.
- 4) Metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dipakai untuk melacak antibodi IgG, IgM dan IgA terhadap antigen LPS O9, antibodi IgG terhadap antigen flagella d (Hd) dan antibodi terhadap antigen Vi *S. typhi*.
- 5) Pemeriksaan dipstik, mendeteksi antibodi IgM spesifik terhadap antigen LPS *S. typhi* dengan menggunakan membran nitroselulosa yang mengandung antigen *S. typhi* sebagai pita pendeteksi dan antibodi IgM *antihuman immobilized* sebagai reagen kontrol.

d. Identifikasi dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode lain untuk identifikasi bakteri *Salmonella typhi* yaitu dengan mendeteksi DNA (asam nukleat) bakteri *Salmonella typhi* dalam darah dengan teknik hibridisasi asam nukleat atau amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR). *Polymerase Chain Reaction* atau PCR adalah teknik cepat untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan 2 primer untai pendek. Dengan teknik ini sejumlah kecil frgamen DNA yang diinginkan akan diamplifikasi secara eksponensial sampai jutaan kopi dalam beberapa jam. Deteksi produk amplifikasi dapat dilakukan dengan visualisasi menggunakan elektroforesis agarosa, dengan *enzyme immunoassay* menggunakan deteksi *probe based colorometric* atau teknologi emisi fluoresens (Sulistyaningsih, 2007).

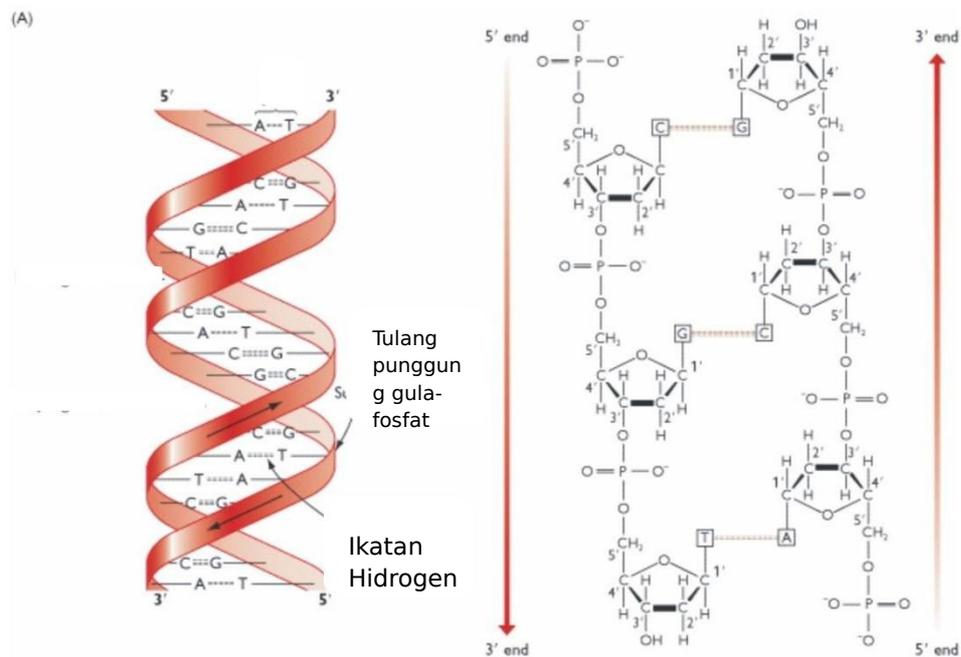
Kendala yang sering dihadapi pada penggunaan metode PCR ini meliputi prosedur teknis harus dilakukan dengan sangat cermat, biaya yang cukup tinggi, dan teknis yang relatif rumit (Prasetyo & Ismoedijanto, 2011).

2.3 Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)

Asam nukleat merupakan komponen utama dalam inti sel, terdiri atas DNA (*deoxy ribonucleic acid*) dan RNA (*ribonucleic acid*). Asam nukleat terdapat juga dalam organel mitokondria (DNA mitokondria) (Hartati, 2010). Asam nukleat merupakan molekul polimer, polinukleotida yang tersusun dari monomer nukleotida (Suharsono, 2010).

Asam deoksiribonukleat (DNA) merupakan salah satu jenis asam nukleat yang berperan sebagai materi genetik yang menurunkan sifat tertentu dari satu generasi ke generasi turunannya. Unit penyusun DNA adalah nukleotida (mononukleotida). Nukleotida tersusun dari gugus fosfat, basa nitrogen, dan gula pentosa (Toha, 2001).

Terdapat dua golongan basa nitrogen, yaitu pirimidin yang hanya mempunyai cincin 6-karbon dan purin yang memiliki cincin 6-karbon dan cincin 5-karbon. Purin terdiri dari adenin dan guanin sedangkan pirimidin terdiri atas sitosin dan timin. Basa-basa nitrogen dinyatakan dengan huruf awal masing-masing, jadi basa nitrogen pada DNA terdiri atas A, G, C, dan T (Neidle, 1999).



Gambar 2.3 Struktur dsDNA yang dibentuk dari gula deoksiribosa, gugus fosfat dan basa nitrogen (adenin, timin, guanin, dan sitosin) (Brown, 2002).

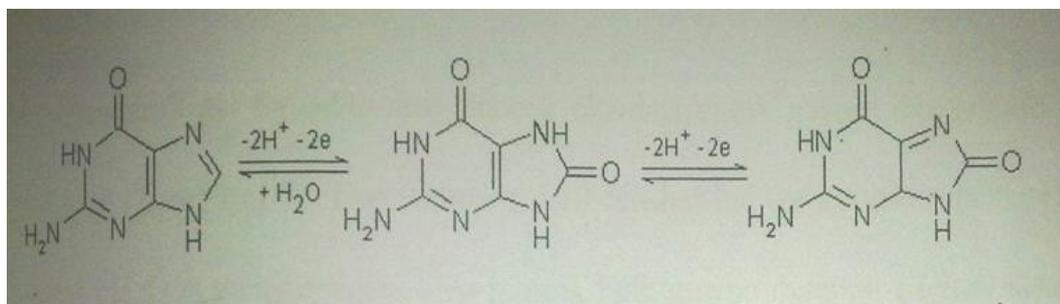
2. 4 Sifat Elektrokimia DNA

Sejak tahun 1960, asam nukleat dikenal sebagai zat elektroaktif sehingga banyak penelitian telah dilakukan untuk mempelajari sifat listrik asam nukleat. Studi awal elektrokimia asam nukleat ditunjukkan dengan elektrode raksa. Palecek melaporkan bahwa DNA dan RNA dapat direduksi pada elektrode raksa, dan bahwa sitosin, adenin, dan guanin merupakan senyawa yang elektroaktif. Adenin dan sitosin dapat direduksi pada elektrode raksa dalam larutan netral pada potensial sekitar $-1,40$ V, sedangkan guanin, dapat direduksi pada potensial yang sangat negatif ($< -1,50$ V) kemudian dapat dioksidasi pada potensial $-0,30$ V (Rivas *et al.*, 2005). Timin dan urasil tereduksi hanya dalam media bebas air pada potensial yang sangat negatif ($< -1,50$ V) (Palecek & Fojta, 2001).

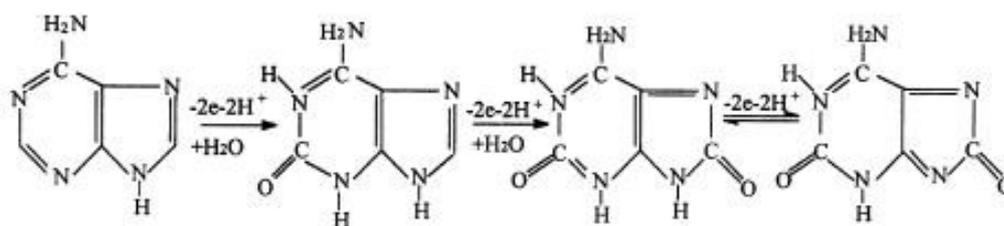
Beberapa tahun kemudian, Brabec dan Dryhurst memperkenalkan elektrode padatan untuk mempelajari sifat elektrokimia asam nukleat. Mereka melaporkan bahwa hanya adenin dan guanin yang elektroaktif pada bahan karbon

dan keduanya teroksidasi pada potensial yang sangat positif ($> +1,50$ V) (Brabec & Dryhurst, 1978). Sifat dari asam nukleat pada elektrode padatan pertama diselidiki pada elektrode grafit pirolitik. DNA atau RNA rantai tunggal memberikan dua puncak dengan harga potensial yang tinggi. Puncak-puncak ini terjadi karena oksidasi dari guanin dan adenin yang terdapat pada DNA atau RNA (Rivas *et al.*, 2005).

Beberapa peneliti telah melakukan pengujian untuk menerangkan reaksi yang terjadi pada permukaan elektrode. Gambar 2.4 menunjukkan proses oksidasi basa guanin menjadi 8-okso guanin.



Gambar 2.4 Proses oksidasi basa guanin (Erdem *et al.*, 2004). Sedangkan pada (Gambar 2.5) menunjukkan proses oksidasi dari basa adenin mengikuti reaksi berikut,



Gambar 2.5 Proses oksidasi basa adenin (Zhenxin *et al.*, 2000).

DNA rantai ganda (dsDNA) memberikan puncak oksidasi yang lebih rendah daripada DNA rantai tunggal (ssDNA). Basa nitrogen dalam dsDNA tersembunyi di dalam heliks dan kekakuan struktur ini menyebabkan basa nitrogen jauh dari permukaan elektrode. Hasilnya, proses oksidasi terhambat (Alvarez *et al.*, 2004).

Sifat elektrokimia DNA juga berbeda-beda untuk tiap elektrode yang digunakan. Erdem *et al.*, melaporkan potensial oksidasi untuk guanin dan adenin lebih rendah (lebih negatif) menggunakan elektrode komposit grafit-epoksi sebagai transduser daripada elektrode pasta karbon (+1,01 V dan +1,20 V), pensil grafit (+1,05 V dan +1,25 V), karbon gelas (+0,80 V dan +1,11 V) dan grafit pirolitik (+1,12 V dan 1,37 V). Dalam bahan karbon, DNA terstabilkan pada elektrode dengan interaksi elektrostatis melalui muatan negatif hidrofilik gula fosfat dengan basa-basa DNA-nya yang berorientasi ke arah larutan (Erdem *et al.*, 2004).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) fragmen DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya (Mahmuddin, 2010).

Tahapan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ditunjukkan pada Gambar 2.6 terdiri dari:

1) Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen.

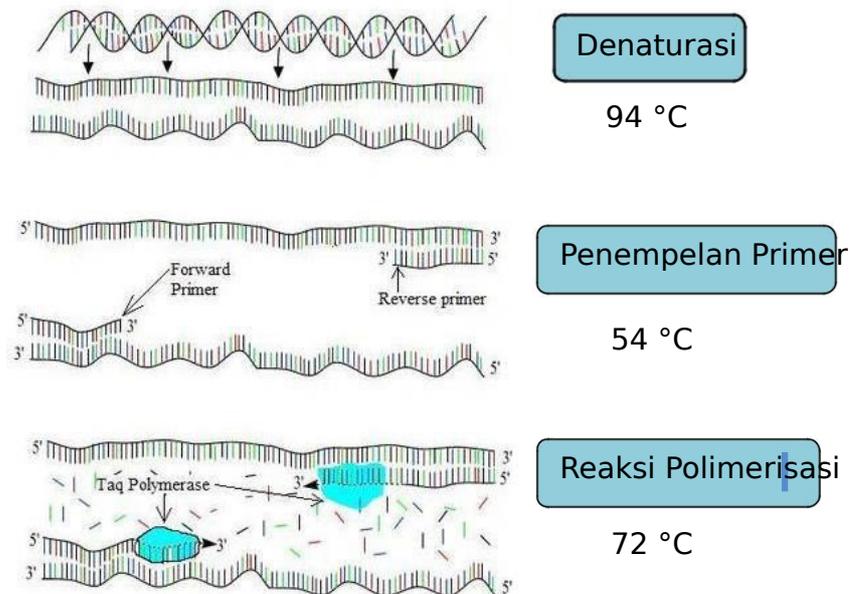
Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90°C – 95°C.

2) Penempelan primer

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C – 60°C.

3) Reaksi polimerisasi (*extension*)

Reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai pada umumnya terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase (Mahmuddin, 2010).

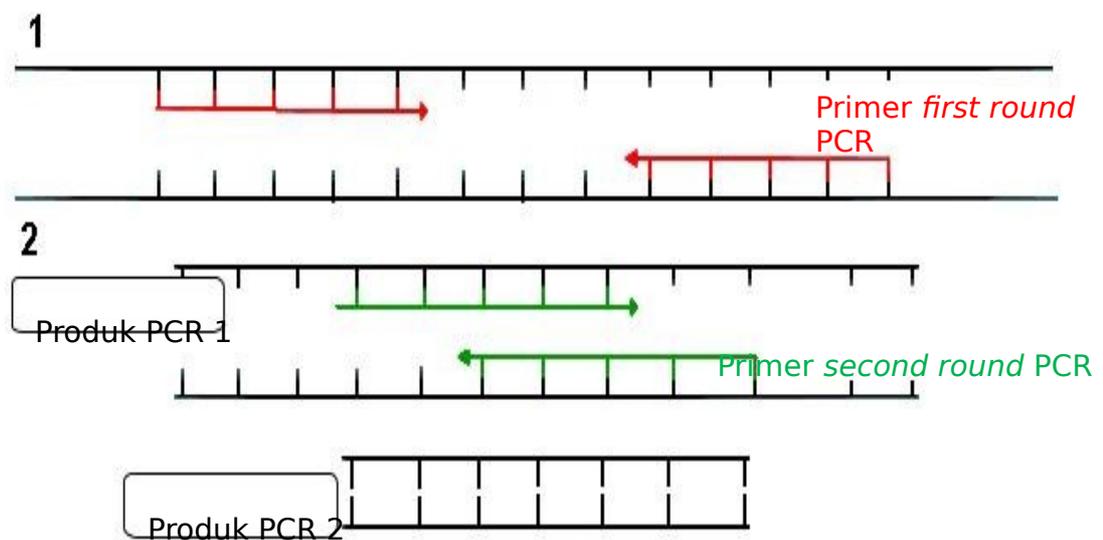


Gambar 2.6 Skema siklus PCR yang terdiri dari tiga tahap reaksi: (1) DNA templat didenaturasi, (2) penempelan primer terhadap daerah spesifik pada templat *single strand*, dan (3) perpanjangan primer oleh DNA polimerase (Bianchi, 2010).

2. 6 Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR)

Nested PCR terdiri dari dua siklus PCR yaitu *first round PCR* dan *second round PCR*. *Nested PCR* menggunakan dua pasang primer PCR. Pasangan primer pertama mengamplifikasi fragmen DNA seperti umumnya dilakukan pada teknik PCR biasa. Produk PCR disebut amplicon. Amplicon ini digunakan sebagai templat untuk proses *second round PCR* yang berada di dalam amplicon yang pertama dengan tujuan menghasilkan produk yang lebih pendek dan spesifik. *Nested PCR* merupakan salah satu metode yang dapat memperkecil produk PCR

non spesifik. Ada dua macam produk yang dihasilkan dari proses PCR yaitu produk PCR spesifik dan non spesifik. Produk PCR spesifik merupakan produk PCR dengan panjang basa sesuai dengan panjang basa target. Sedangkan produk PCR non spesifik merupakan produk PCR yang tidak hanya mengamplifikasi fragmen DNA yang dikehendaki, tetapi juga fragmen DNA organisme lain yang terdapat dalam sampel tersebut. Oleh karena itu, *nested* PCR digunakan untuk mengurangi produk PCR non spesifik yang terjadi dalam tahapan PCR (Khabibah, 2009).

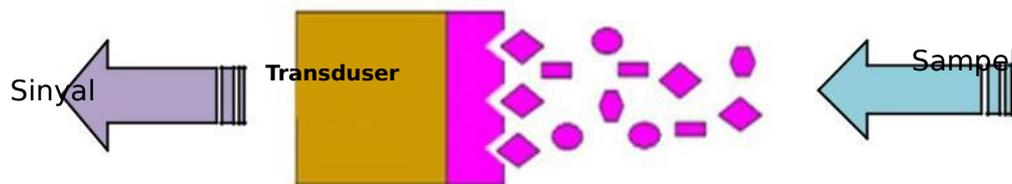


Gambar 2.7 Skema siklus *nested* PCR yang terdiri dari dua tahap reaksi PCR (Reekie, 2005).

2. 7 Biosensor DNA Elektrokimia

Sensor kimia adalah suatu piranti yang dapat mentransformasi informasi kimia menjadi suatu sinyal analitik yang dapat diukur. Sensor kimia terdiri dari dua komponen dasar yang dihubungkan secara berurutan: suatu sistem pengenalan kimia dan transduser fisika. Biosensor adalah sensor kimia dimana sistem pengenalannya memanfaatkan mekanisme reaksi biokimia (Hartati, 2010).

Dalam biosensor DNA elektrokimia, suatu urutan pendek (20-40 mer) oligonukleotida sintetis atau biasa disebut "*probe*" diamobilisasi pada permukaan elektrode untuk membuat lapisan pengenal. Elektrode yang mengandung probe teramobilisasi kemudian dicelupkan ke dalam suatu larutan sampel hasil amplifikasi PCR yang mengandung oligonukleotida target yang akan diuji. Ketika urutan target berpasangan secara tepat dengan probe, terbentuk hibrid pada permukaan elektrode. Terjadinya hibridisasi spesifik antara *probe* dan komplementernya dideteksi menggunakan transduser elektrokimia dibawah kondisi pH, kekuatan ion, dan suhu tertentu (Hartati, 2010).



Gambar 2.8 Prinsip biosensor voltametri. Target berinteraksi dengan *probe* yang diamobilisasi pada permukaan elektrode teraktivasi. Hasil sinyal biologis ini diubah menjadi sinyal fisik (listrik) oleh transduser. Substansi yang tidak mampu berinteraksi dengan *probe* tidak akan menghasilkan sinyal (Kumar & Gupta, 2005).

Metode elektrokimia cocok digunakan untuk diagnosis berbasis DNA karena reaksi elektrokimia memberikan sinyal listrik langsung maka tidak dibutuhkan peralatan transduksi sinyal. Urutan *probe* dapat teramobilisasi dengan cepat pada bermacam-macam elektrode. Deteksi sinyal elektrokimia dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung berdasarkan proses oksidasi basa nitrogen dan secara tidak langsung berdasarkan penggunaan indikator (Drummond *et al.*, 2003).

2.7.1 Tahap Amobilisasi

Probe diamobilisasi pada permukaan elektrode. Dalam hal ini, sifat elektrode memiliki peranan yang sangat penting. *Probe* diamobilisasi agar dapat terjadi hibridisasi dengan urutan komplementernya yaitu DNA target. Selanjutnya dengan adanya *probe* dan DNA target dapat terjadi hibridisasi (Pedano & Rivas, 2005).

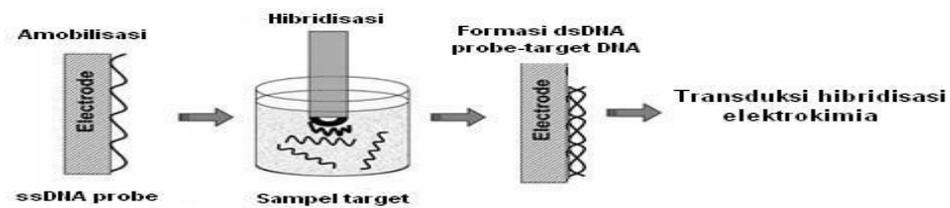
Dalam material berbasis karbon, DNA distabilkan pada transduser dengan interaksi elektrostatik melalui muatan negatif gugus fosfat yang hidrofilik dengan basa-basa yang berorientasi ke dalam larutan (Palecek *et al.*, 1998). Elektrode berbahan dasar karbon memiliki beberapa keunggulan dibanding elektrode lainnya, diantaranya tidak mahal, sifat adsorpsi permukaan, dan sensitif (McCreery & Cline, 1996).

Ada beberapa syarat pada proses amobilisasi ini, yaitu: (1) Amobilisasi memberikan lapisan permukaan yang stabil; (2) Komponen biologi tidak rusak karena prosedur amobilisasi yang dilakukan; (3) Aktivitas dan kapasitas pengikatan tidak berkurang secara signifikan; (4) Spesifisitas komponen biologi tidak berubah (Keusgen, 2002).

2.7.2 Tahap Pendeteksian Hibridisasi

Perangkat biosensor harus mengandung molekul yang memungkinkan terjadinya pertemuan antarpermukaan, dan suatu transduser sinyal yang dapat dihubungkan dengan alat pembacaan. DNA digunakan pada biosensor, karena interaksi pasangan basa di antara sekuen komplementernya yang spesifik dan kuat (Drummond *et al.*, 2003).

Pada biosensor DNA elektrokimia, urutan pendek oligonukleotida sintetik (*probe*) diamobilisasi pada permukaan elektrode sebagai lapisan pengenalan. *Probe* yang diamobilisasi pada elektrode dicelupkan ke dalam sampel hasil PCR yang mengandung oligonukleotida target yang akan diuji. Ketika urutan DNA target berpasangan dengan DNA *probe* maka akan terbentuk hibrida pada permukaan elektrode. Terjadinya hibridisasi spesifik antara *probe* dan DNA target dideteksi menggunakan transduser elektrokimia (Hartati, 2010).



Gambar 2.9 Skema umum tahapan proses transduksi sinyal hibridisasi DNA secara elektrokimia (Rivas *et al.*, 2005).

Setelah hibridisasi dilakukan untuk waktu tertentu, reaksi oksidasi basa-basa DNA pun terjadi saat dilakukan proses pembacaan potensial pada alat elektrokimia. Peristiwa hibridisasi biasanya dideteksi dengan adanya peningkatan sinyal arus dari indikator redoks (yang berasosiasi dengan DNA rantai ganda) atau dari perubahan parameter elektrokimia (misalnya konduktivitas atau kapasitansi), sebagai aktivitas redoks asam nukleat hasil dari pembentukan rantai ganda (Wang, 2002).

Metode deteksi hibridisasi DNA yang akhir-akhir ini dikembangkan adalah metode tanpa indikator berdasarkan sinyal intrinsik DNA. Metode ini berkaitan dengan elektroaktivitas basa-basa asam nukleat dan tidak menggunakan reagen lain untuk mendapatkan sinyal dari proses hibridisasi DNA. Pada metode ini hanya diamati salah satu aktivitas basa penyusun asam nukleat untuk menandakan adanya proses hibridisasi. Diantara empat basa penyusun asam nukleat, guanin merupakan basa nitrogen yang paling mudah dioksidasi, sehingga dipilih untuk pendeteksian hibridisasi tanpa indikator (Wang, 2002).

2.8 Voltammetri

Voltammetri adalah suatu teknik analisis berdasarkan pada pengukuran arus yang mengalir melalui elektrode yang dicelupkan dalam larutan yang mengandung senyawa elektroaktif (Protti, 2001). Variasi potensial diberikan secara sistematis pada analit sehingga mengalami oksidasi-reduksi di permukaan elektrode. Arus yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi analit di dalam

larutan. Semua unsur yang dapat mengalami oksidasi reduksi di permukaan elektrode dapat dianalisis secara voltametri (Saryati & Wardiyati, 2007).

Metode voltametri mempunyai keunggulan dibandingkan dari beberapa metode lain diantaranya penyediaan cuplikan yang sederhana dan waktu analisis yang cepat. Penyediaan cuplikan yang diperlukan hanya pelarutan tanpa pemekatan dan pemisahan unsur-unsur mayornya, sehingga mengurangi sumber kesalahan, dengan batas deteksi sampai 0,1 µg/L dengan peralatan yang tidak begitu mahal (Saryati & Wardiyati, 2007).

Pada umumnya metoda voltametri menggunakan tiga elektrode, yaitu elektrode kerja, elektrode pembanding dan elektrode pembantu (pelengkap) yang direndam di dalam larutan elektrolit pembantu di dalam sel elektrokimia. Elektrode kerja adalah elektrode yang memberi dan menerima respon yang menyebabkan terjadinya reaksi oksidasi dan reduksi pada analit. Elektrode pembanding memiliki nilai potensial yang tetap dan stabil. Voltametri dapat dibagi menjadi beberapa metode yaitu (Skoog *et al.*, 1996):

- a. Voltametri Linear
- b. Voltametri Siklik
- c. Voltametri Gelombang Persegi
- d. Voltametri *Stripping*
- e. Voltametri Pulsa Diferensial (VPD)

2.9 Voltametri Pulsa Diferensial (VPD)

Voltametri pulsa diferensial merupakan teknik yang sangat berguna dalam pengukuran senyawa-senyawa tingkat runutan (yang sedikit sekali terdapat secara alami) baik dalam bentuk spesi organik ataupun anorganik (Wang, 2002). Dalam metode ini potensial yang diberikan berubah setiap waktu. Arus dibaca menjelang berakhirnya tiap pulsa (selisih pembacaan antara T, atau sebelum dan sesudah tiap pulsa). Bila arus faradiknya kecil, arus pulsanya kecil, tetapi dengan datangnya gelombang voltametri dan dengan meningkatnya arus faradik, arus

pulsa akan meningkat pula, dan arus ini akan mencapai nilai maksimum pada potensial setengah gelombang untuk sistem yang dianalisis (Basset *et al.*, 1994).

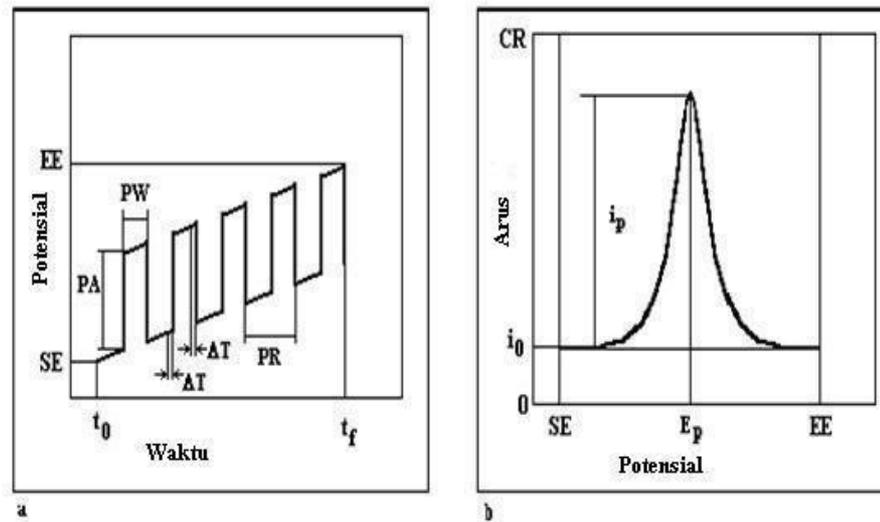
Arus listrik dalam voltammetri yang melalui elektrode kerja mempunyai dua komponen (Protti, 2001):

1. Arus faradik, mengikuti hukum Faraday yang berhubungan dengan pelepasan suatu senyawa elektroaktif.
2. Arus kapasitif, yang dihasilkan oleh perkembangan dari lapisan muatan ganda pada permukaan elektrode dan larutan. Lapisan ganda ini berhubungan dengan tingginya konsentrasi elektrolit pendukung dalam larutan dan bertindak sebagai kondensor dengan kapasitas tinggi. Total arus yang mengalir melalui elektrode berhubungan dengan jumlah arus muatan (arus kapasitif) dari kondensor ini dan arus faradik.

Pada voltammetri arus faradik yang terjadi biasanya berhubungan dengan polarisasi elektrode pada elektrode kerja. Polarisasi elektrode terjadi ketika laju reaksi analit diatur dengan salah satu fenomena berikut ini (Protti, 2001):

1. Laju transfer massa menuju atau dari permukaan elektrode. Tipe ini disebut dengan polarisasi konsentrasi.
2. Laju transfer elektron pada permukaan elektrode, yang dikenal dengan polarisasi kinetik.

Arus kapasitif bersifat gangguan terhadap arus faradik. Ketika adanya spesi depolarisasi pada konsentrasi rendah dalam larutan, kadang-kadang arus kapasitif dapat lebih tinggi daripada arus faradik. Dalam kasus ini pengukuran arus faradik menjadi sulit (Protti, 2001). Gangguan inilah yang menjadi salah satu alasan berkembangnya teknik voltammetri pulsa diferensial sebagai teknik analisis dalam mengatasi besarnya arus kapasitif (atau arus nonfaradik) yang umum terjadi pada teknik klasik voltammetri pulsa normal (atau pembacaan linier).



Gambar 2.10 Voltametri pulsa diferensial. a. pembacaan potensial pada proses voltametri diferensial pulsa; b. Hasil plot voltamogram; SE= potensial awal; EE= potensial akhir; t_0 , t_f = waktu awal dan waktu akhir pembacaan potensial, i_0 = arus awal pembacaan; i_p = arus puncak; E_p = puncak potensial; T =waktu pembacaan arus faradik; PA= amplitudo pulsa potensial; PW= waktu pulsa; PR= waktu perulangan pulsa (Protti, 2001).

Voltammogram yang dihasilkan terdiri dari tinggi arus puncak yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit :

$$i_p = k C \sqrt{t_m} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right)$$

dengan t_m = waktu setelah penerapan pulsa, $\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)$, ΔE adalah amplitudo pulsa. Nilai maksimum hasil bagi $1-\sigma/1+\sigma$, diperoleh dengan amplitudo pulsa yang besar. Potensial puncak (E_p) dapat digunakan untuk identifikasi spesi dengan nilai potensial mendekati nilai potensial tengah gelombang polarografi (Wang, 2002).

BAB III BAHAN DAN METODE

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

3.1.1.1 Bahan Penelitian

Kultur bakteri *Salmonella typhi*, enam urutan oligonukleotida sintesis sebagai berikut:

Primer *forward* : 1. 5'-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3' (1060-1077)

2. 5'-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3' (1083-1102)

Primer *reverse* : 1. 5'-TTA ACG CAG TAA AGA GAG-3' (1504-1521)

2. 5'-TGG AGA CTT CGG TTG CGT AG-3' (1407-1426)

(Song *et al.*, 1993)

DNA *Probe* : 5'-IAI CTI TIA AAT TTI ITI IC-3' (1108-1128)

Target sintesis : 5'-CTC GAC ACT TTA AAC CAC CG-3' (1128-1108)

DNA non-komplemen : 5' – ACT TAA ATT TTC -3'

Oligonukleotida tersebut diperoleh dari PT. Genetika Science Indonesia.

3.1.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah bufer asetat 0,50 M pH 5,0 (ABS), bufer fosfat (PBS) 0,05 M pH 7,0, buffer TAE, *DreamTaq*TM Green PCR Master Mix (2X) (*DreamTaq*TM green buffer, *DreamTaq*TM DNA polimerase, dNTP, dan MgCl₂), etidium bromida, gel agarosa 2%, kalium klorida, 100bp DNA *ladder*, buffer lisis, Proteinase K dan akuabides steril. Perhitungan pembuatan larutan ditunjukkan pada Lampiran 1.

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pensil *rotring*, isi pensil pilot ENO 2B dengan panjang 30 mm dan diameter 0,5 mm, potensiostat Metrohm[®] μ Autolab *type III*, PCR Eppendorf[®] *Mastercycler Personal ICA CE 1200*, *Electrophoresis Power Supply-EP5 301*, Mettler toledo[®] pH meter, Eppendorf[®] *Biophotometer plus*, Eppendorf[®] pipet mikro, dan alat-alat gelas. Gambar alat ditunjukkan pada Lampiran 2.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Pembuatan Larutan

3.2.1.1. Larutan Bufer Asetat

Padatan natrium asetat trihidrat ditimbang sebanyak 34,0216 g kemudian dilarutkan dengan akuades steril. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan tetes demi tetes larutan asam asetat glasial sampai pH yang diinginkan, sehingga diperoleh larutan bufer asetat 0,5 M pH 5,0. Setelah itu, tambahkan akuades steril hingga volume larutan menjadi 500 mL.

3.2.1.2. Larutan Stok Bufer Fosfat

Padatan dinatrium hidrogen fosfat ditimbang sebanyak 89,5350 g kemudian dilarutkan dengan akuades steril. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan tetes demi tetes asam fosfat 85% sampai pH yang diinginkan, sehingga diperoleh larutan bufer fosfat 0,5 M pH 7,0. Setelah itu, tambahkan akuades steril hingga volume larutan menjadi 500 mL.

3.2.1.3. Larutan Stok DNA

Larutan stok DNA *probe*/DNA target 1000 ppm dibuat dengan melarutkan padatan DNA *probe*/DNA target dalam akuabides.

3.2.1.4 Larutan TAE 50X 100 mL

Tris basa 24,2 g ditambahkan 5,71 mL asam asetat glasial dan 10 mL 0,5M EDTA pH 8,0. Kemudian ditambahkan akuabides hingga volume 100 mL.

3.2.2 Prosedur Penelitian

3.2.2.1 Lisis DNA Bakteri *S. typhi*

Kultur cair *S.typhi* dipipet 500 μ L kemudian ditambahkan proteinase-K 5 μ L dan buffer lisis (50mM tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; dan 0,5% Tween 20) 20 μ L. Lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam. Setelah itu dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit kemudian disentrifugasi.

3.2.2.2 Amplifikasi Fragmen Gen *flagellin S. typhi* dengan *Nested PCR*

Sebanyak 25 μ L *DreamTaq*TM Green PCR Master Mix (2X) yang mengandung *DreamTaq*TM green buffer , *DreamTaq*TM DNA polimerase, dNTP, dan MgCl₂ dimasukkan ke dalam tabung mikro 200 μ L. Kemudian secara

berurutan ditambahkan 2 μL primer *forward* dan primer *reverse* 20 pmol, 5 μL DNA template *S. typhi* hasil lisis dan 16 μL akuabides steril. Campuran tersebut dihomogenkan dengan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 9 detik, kemudian dimasukkan ke dalam alat PCR Eppendorf® Mastercycler Personal ICA CE 1200. Pertama-tama dilakukan denaturasi awal (T = 95°C) selama 5 menit. Kemudian reaksi PCR diatur sebanyak 35 siklus, dengan kondisi PCR untuk setiap siklusnya meliputi; denaturasi (T = 95°C) selama 30 detik, proses *annealing* (T = 63°C) selama 1 menit, dan *extension* (T = 72°C) selama 1 menit. Kemudian dilakukan proses *extension* akhir (T = 72°C) selama 7 menit.

Setelah didapatkan amplifikon PCR, kemudian amplikon tersebut di amplifikasi kembali sebanyak 35 siklus. Kondisi PCR siklus kedua sama dengan PCR siklus pertama, perbedaannya hanya diproses *annealing* (T = 61°C) selama 1 menit dan proses *extension* akhir (T = 72°C) selama 7 menit.

3.2.2.3 Karakterisasi Amplikon PCR melalui Elektroforesis Gel Agarosa

DNA amplikon PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2% (b/v) menggunakan alat *Electrophoresis Power Supply*-EPS 301. Komposisi gel agarosa dibuat dengan melarutkan 0,8 gram agarosa dalam 40 mL bufer TAE 1X. Larutan tersebut dipanaskan hingga agarosa larut dan tidak bergelembung, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 50-60°C. Kemudian ditambahkan 2 μL larutan etidium bromida. Lalu dituangkan ke dalam cetakan gel yang memiliki sisir sebagai pembentuk sumur gel. Setelah padat, gel ditempatkan pada alat elektroforesis dan direndam dengan bufer TAE 1X. Pada masing-masing sumur gel, dimasukkan 10 μL sampel hasil PCR dan 100 bp DNA *ladder*. Proses elektroforesis ini dilakukan dalam bufer TAE 1X sebagai media penghantar arus pada tegangan 80 volt, 80 mA selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi

dengan lampu UV. DNA amplikon diukur konsentrasinya dengan alat Eppendorf[®] *biophotometer plus*.

3.2.2.4 Desain Urutan DNA *probe*

Urutan DNA *probe* didesain menggunakan *software* NCBI (www.ncbi.nlm.gov.nih) melalui metode BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*[®]).

3.2.2.5 Pretreatment Elektrode Grafit Pensil

EGP dikarakterisasi dengan teknik analisis voltametri pulsa diferensial. EGP dipasang pada potensiostat dalam larutan 0,05 M bufer asetat pH 5,0 dan mode diatur pada program voltametri pulsa diferensial. Kondisi kerja diatur untuk pembacaan pada potensial +1,4 V dengan waktu pembersihan 60 detik.

3.2.2.6 Pengukuran Sinyal Oksidasi Guanin DNA

EGP yang telah di-*pretreatment*, dicelupkan ke dalam 100 μ L DNA *probe* 20 ppm dan DNA target sintesis 20 ppm masing-masing selama 20 menit. Sinyal oksidasi dari masing-masing DNA diukur menggunakan metode analisis voltametri pulsa diferensial pada daerah potensial +0,4 sampai +1,4 V.

3.2.2.7 Optimasi Konsentrasi DNA amplikon gen *flagellin S.typhi*

EGP yang telah di-*pretreatment* dicelupkan ke dalam 100 μ L DNA *probe* 20 ppm selama 20 menit. Lalu EGP dicuci dengan larutan bufer asetat 0,5 M (pH 5,0) selama 5 detik dan dicelupkan ke dalam 100 μ L larutan DNA target sintesis 20, 30, 40, 60 dan 80 ppm dengan waktu hibridisasi 20 menit. Lalu EGP dicuci dengan larutan bufer fosfat 0,5M (pH 7,0). Sinyal oksidasi yang terjadi diamati

dengan analisis voltammetri pulsa diferensial pada daerah potensial +0,4 V sampai +1,4 V pada kondisi optimum.

3.2.2.8 Pengukuran Sinyal Oksidasi Guanin Hasil Hibridisasi DNA probe–

DNA amplikon Gen *flagellin S. typhi*

Larutan DNA amplikon *S. typhi* diukur konsentrasinya dengan alat Eppendorf[®] *biophotometer plus*, kemudian diencerkan dengan akuabides hingga volume 40 ppm. Selanjutnya didenaturasi dengan pemanasan pada 95°C selama 5 menit dan segera direnaturasi dalam penangas es (Kerman *et al.*, 2004). EGP yang telah di-*pretreatment*, dicelupkan ke dalam 100 µL DNA probe 20 ppm selama 20 menit, lalu EGP dicuci dengan larutan bufer asetat 0,5 M (pH 5,0) selama 5 detik. Kemudian dicelupkan pada DNA amplikon *S. typhi* pada konsentrasi optimum selama 20 menit, dan dicuci dengan larutan bufer fosfat 50 mM (pH 7,0). Sinyal oksidasi dari masing-masing DNA diukur menggunakan metode analisis voltammetri pulsa diferensial pada daerah potensial +0,4 sampai +1,4 V.

3.2.2.9 Pengukuran Sinyal Oksidasi Guanin Hasil Hibridisasi DNA probe –

DNA non-komplemen

EGP yang telah di-*pretreatment*, dicelupkan ke dalam 100 µL DNA probe 20 ppm selama 20 menit, kemudian EGP dicuci dengan larutan bufer asetat 0,5 M (pH 5,0) selama 5 detik. Selanjutnya EGP dicelupkan pada DNA non-komplemen selama 20 menit, dan dicuci dengan larutan bufer fosfat 50 mM (pH 7,0). Sinyal oksidasi guanin hasil hibridisasi diukur menggunakan metode analisis voltammetri pulsa diferensial pada daerah potensial +0,4 sampai +1,4 V.

3.3 Bagan Alir Penelitian

Bakteri *S.typhi*

- Dikultur cair
- Lisis DNA

DNA templat

- Diampifikasi dengan metode *Nested PCR*

- Dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2%

Amplikon *Nested PCR* fragmen gen *flagellin S.typhi*

- Didenaturasi

ssDNA *S.typhi*

EGP

- Diaktivasi pada potensial +1,4 V

EGP teraktivasi

- Diamobilisasi DNA *probe* 20 ppm selama 20 menit

EGP - DNA *probe*

- Dihybridisasi dengan DNA target sintesis/ pada kondisi optimum
- Dihybridisasi dengan DNA target sintesis/ sampel selama sampel

Hibridisasi :

- EGP-*probe*-DNA target
- EGP-*probe*-amplikon *first round PCR*
- EGP-*probe*-amplikon *second round PCR*
- EGP-*probe*-DNA non

- Dilakukan pengukuran sinyal arus oksidasi guanin secara VPD

Parameter Analitik

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Biosensor voltametri berdasarkan proses pengenalan urutan pendek asam nukleat merupakan metode laboratorium yang sedang berkembang pesat ke arah pengujian yang cepat dan spesifik terhadap penyakit infeksi maupun genetik. Biosensor voltametri dapat digunakan untuk diagnosis penyakit yang disebabkan oleh virus maupun bakteri patogen seperti hepatitis C, demam dengue, *Human Papilloma Virus* (HPV), dan lain-lain. Pada penelitian ini dilakukan pendeteksian gen *flagellin S. typhi* secara *nested* PCR dan biosensor voltametri pulsa diferensial berdasarkan sinyal guanin target.

4.1 Lisis DNA Bakteri *S. typhi*

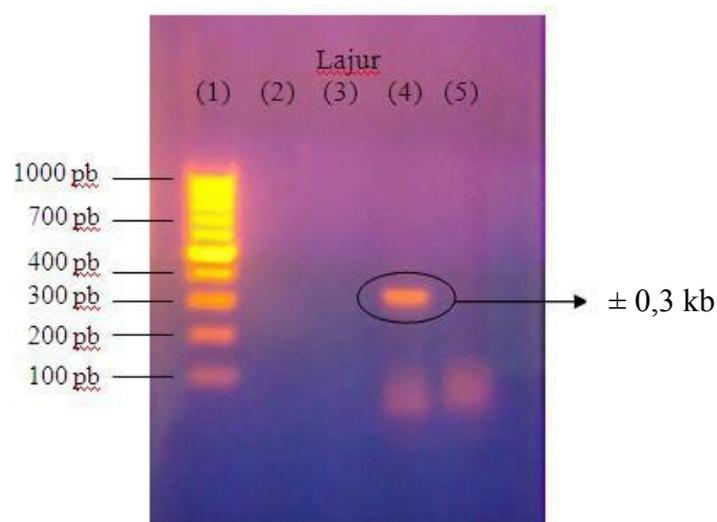


Gambar 4.1 Hasil Lisis DNA *S. typhi*

Lisis dilakukan untuk merusak membran sel sehingga DNA dapat diisolasi. Pemecahan membran sel dilakukan dengan menambahkan enzim proteinase K yang dapat memutuskan ikatan peptida dari protein penyusun membran sehingga lapisan membran rusak. Kemudian ditambahkan buffer lisis yang mengandung 50 mM tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; dan 0,5% Tween 20. Tris_HCl pH 8,0 berfungsi sebagai buffer yang mengondisikan agar enzim proteinase K bekerja pada pH optimum. Tween 20 merupakan detergen (pengemulsi) yang dapat menyebabkan integritas dari fosfolipid dan protein hidrofob sehingga DNA dapat keluar. Setelah DNA keluar, maka ada enzim nuklease yang akan memfragmentasinya. Untuk mencegah DNA terfragmentasi

maka digunakan EDTA pH 8,0 yang dapat membentuk khelat dengan Mg^{2+} atau logam lain yang berfungsi sebagai kofaktor enzim nuklease. Dengan demikian, enzim nuklease menjadi tidak aktif dan DNA tidak terfragmentasi. Penambahan EDTA ini tidak boleh berlebihan atau kekurangan, artinya pengkhelatan tidak boleh terlalu kuat dan tidak boleh terlalu lemah karena akan mengganggu proses PCR yang juga memerlukan ion logam Mg^{2+} . Inkubasi pada suhu $55^{\circ}C$ selama 1 jam bertujuan untuk mengaktifkan kerja enzim Proteinase K karena pada suhu tersebut aktivitas optimum. Kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit untuk mendenaturasi atau menonaktifkan enzim Proteinase K. Enzim Proteinase K dinonaktifkan karena dapat memotong enzim *taq* polimerase dalam proses PCR. Hasil lisis DNA *S.typhi* ini digunakan sebagai templat pada metode *nested* PCR.

4.2 Amplifikasi Fragmen Gen *flagellin S. typhi* dengan *Nested* PCR



Gambar 4.2 Elektroforegram. Hasil karakterisasi produk *nested* PCR gen *flagellin S.typhi* dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Lajur 1: 100 bp DNA ladder; Lajur 2: amplicon *first round* PCR; Lajur 3: kontrol negatif *first round* PCR; Lajur 4: Amplicon *second round* PCR; dan Lajur 5: kontrol negatif *second round* PCR.

Metode *nested* PCR digunakan untuk mendeteksi *S. typhi* karena metode ini memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan metode PCR biasa. Pada metode *nested* PCR produk non spesifik dapat diminimalisir.

Pada penelitian ini digunakan dua pasang primer, yaitu sepasang primer pada *first round* PCR dan sepasang primer pada *second round* PCR. Sepasang primer pada *first round* PCR yaitu primer *forward* 5'-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3' dan primer *reverse* 5'-TTA ACG CAG TAA AGA GAG-3'. Sepasang primer pada *first round* PCR berfungsi sebagai primer universal. Pada *second round* PCR, primer *forward* 5'-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3' dan primer *reverse* 5'-TGG AGA CTT CGG TTG CGT AG-3' berfungsi sebagai batas awal dan akhir suatu urutan DNA gen *flagellin S.typhi* yang spesifik untuk diamplifikasi. Pada reaksi *first round* PCR, DNA gen *flagellin S.typhi* diamplifikasi pada urutan DNA ke-1060 hingga urutan ke-1521 sepanjang 462 pb. Urutan ampikon *first round* PCR dapat dilihat pada Lampiran 3.

Ampikon yang dihasilkan dari *first round* PCR digunakan sebagai templat pada *second round* PCR. Pada *second round* PCR, gen *flagellin S. typhi* diamplifikasi pada urutan DNA ke-1083 sampai urutan ke-1426 sehingga dihasilkan fragmen DNA sepanjang 344 pb. Pada metode *nested* PCR ini dihasilkan fragmen DNA spesifik gen *flagellin S.typhi*.

Selain templat dan primer, komponen-komponen lain yang berperan penting pada proses PCR yaitu *master mix* (buffer *taq* polimerase, MgCl₂, dNTP, dan *taq* DNA polimerase) dan ddH₂O. Buffer *taq* polimerase berfungsi untuk mendapatkan pH optimum kinerja *taq* DNA polimerase. *taq* DNA polimerase berperan sebagai katalisator dalam tahap polimerisasi DNA. Selain buffer PCR diperlukan juga ion Mg²⁺, ion tersebut berasal dari MgCl₂. MgCl₂ bertindak sebagai kofaktor *taq* DNA polimerase. Konsentrasi Mg²⁺ yang rendah menyebabkan produk PCR yang rendah karena menurunkan kecepatan polimerisasi, namun meningkatkan keakuratan polimerisasi. Sebaliknya, konsentrasi Mg²⁺ yang tinggi menyebabkan hasil PCR tidak spesifik karena mempercepat proses polimerisasi, namun menurunkan keakuratan polimerisasi.

Basa dNTP yang terdiri dari dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP merupakan sumber nukleotida yang akan menempel pada templat.

Setelah fragmen gen *flagellin S.typhi* diamplifikasi kemudian dikarakterisasi dengan teknik elektroforesis gel agarosa 2% dan divisualisasi dengan lampu UV sehingga dihasilkan elektroforegram (Gambar 4.2). Gel agarosa 2% digunakan karena memiliki resolusi yang baik untuk memisahkan fragmen yang kecil.

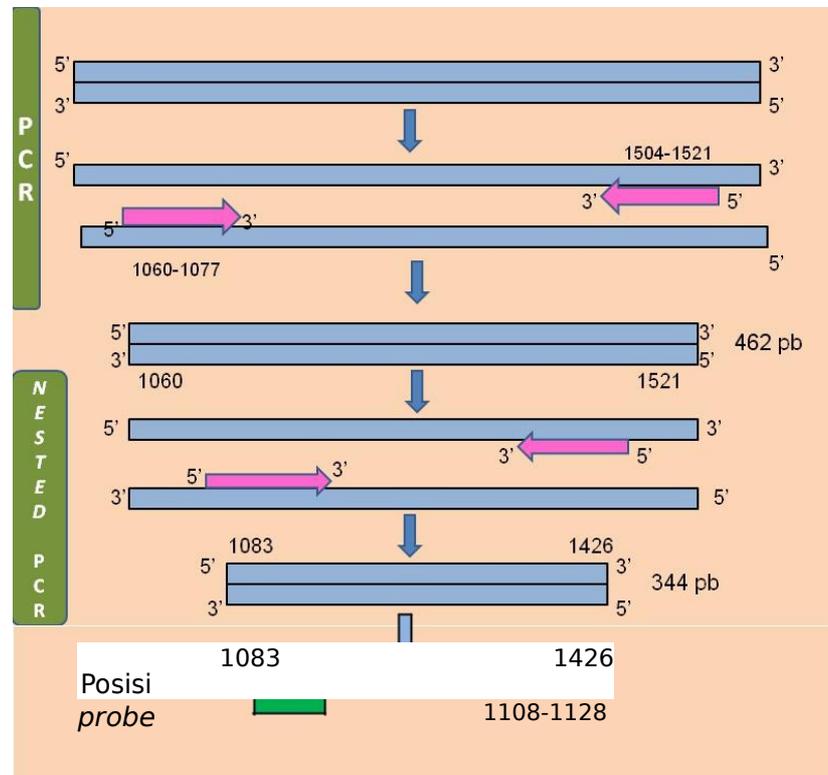
Pada *first round* PCR seharusnya didapatkan amplicon dengan panjang fragmen 462 pb yang ditunjukkan oleh pita yang muncul diantara ukuran fragmen 400–500 pb. Produk PCR yang dihasilkan sedikit sehingga pita sangat tipis dan tidak dapat divisualisasikan oleh gel agarosa 2%. Hasil amplifikasi pada *second round* PCR dapat dikatakan berhasil. Hal ini dikarenakan setelah amplicon dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2% dihasilkan satu pita DNA spesifik yang cukup tebal. Jika dibandingkan dengan ukuran pita pada 100 bp DNA *ladder* maka pita tersebut terletak di antara ukuran fragmen 300–400 pb. Pada penelitian ini panjang fragmen hasil amplifikasi pada *second round* PCR diharapkan sebesar 344 pb.

Amplicon *nested* PCR yang diperoleh diukur konsentrasinya menggunakan Eppendorf[®] *Biophotometer plus*. Kemudian diencerkan hingga konsentrasi 40 ppm. Amplicon *nested* PCR 40 ppm digunakan pada metode biosensor voltametri.

4.3 Desain Urutan *Probe*

Tabel 4.1 Data hasil analisis dengan BLAST[®]

	Urutan dalam	Σ Basa	<i>Identities</i> (%)	Homologi(%)
	Gen Bank			
<i>Probe</i>	1108 - 1128	20	100	0



Gambar 4.3 Skema *nested* PCR dan posisi *probe*

Pada biosensor voltametri digunakan *probe* sepanjang 20 mer sebagai lapisan pengenal yang akan berhibridisasi dengan DNA target sintesis ataupun amplicon *nested* PCR.

Urutan *probe* didesain spesifik sepanjang 20 mer berdasarkan urutan fragmen gen *flagellin S.typhi* yang telah diamplifikasi dengan metode *nested* PCR. Urutan *probe* yang didesain harus memiliki nilai *identities* sebesar 100% artinya *probe* komplemen dengan urutan DNA target sintesis ataupun dengan amplicon *nested* PCR. Selain itu, *probe* harus memiliki persen homologi nol yang berarti *probe* berikatan spesifik pada urutan DNA tertentu dari amplicon *nested* PCR dan *probe* tidak menempel di urutan DNA yang lain pada amplicon *nested* PCR. Dengan demikian, untuk mengetahui bahwa *probe* yang dirancang telah memenuhi syarat-syarat tersebut maka

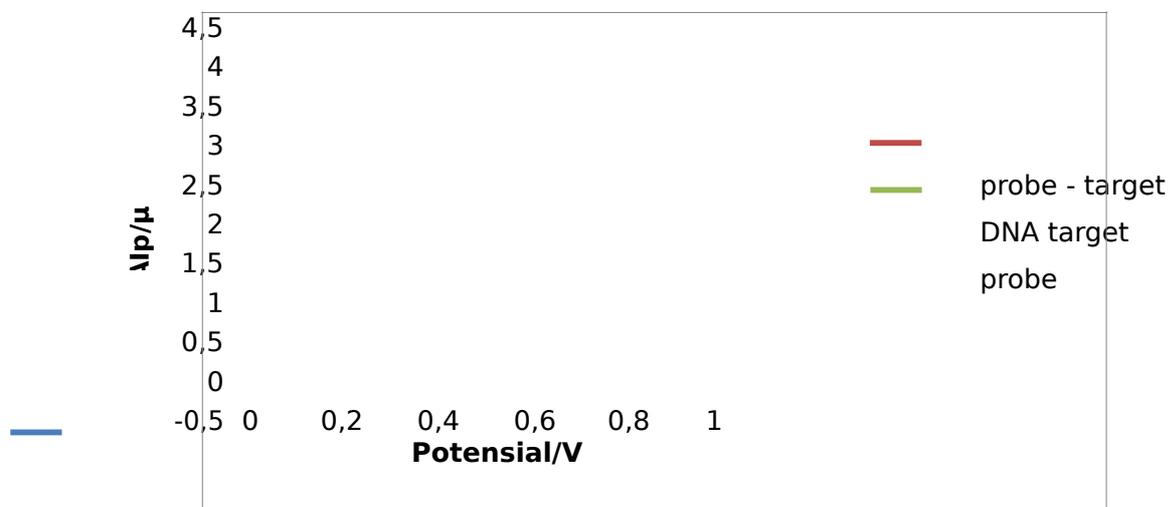
digunakan metode BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*[®]).

Berdasarkan hasil analisis dengan BLAST[®] (Lampiran 4) maka diperoleh urutan *probe* yaitu 5'-IAI CTI TIA AAT TTI ITI IC-3'. Urutan *probe* sepanjang 20 mer ini merupakan urutan pada gen *flagellin S. typhi* ke-1108 hingga 1128. Urutan *probe* tersebut berada pada rentang urutan DNA amplikon *nested PCR*.

Pada penelitian ini digunakan teknik hibridisasi tanpa indikator sehingga guanin pada *probe* digantikan dengan inosin. Inosin memiliki karakteristik mirip guanin, namun inosin tidak memberikan respon elektrokimia berupa sinyal oksidasi. Ketika terjadi hibridisasi *probe*-DNA target maka pengamatan hanya berdasarkan respon oksidasi guanin pada DNA target.

4.4 Deteksi Oksidasi Guanin melalui Voltametri Pulsa Diferensial

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran sinyal oksidasi guanin pada *probe*, DNA target sintesis, dan hibridisasi *probe*-DNA target sintesis yang diamobilisasikan pada elektrode grafit pensil (EGP) yang sudah diaktivasi (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Voltamogram pulsa diferensial untuk pengukuran sinyal oksidasi guanin *probe*, DNA target sintesis, dan hasil hibridisasi *probe*-target sintesis pada kondisi optimum dengan menggunakan elektrode grafit pensil (EGP).

Elektrode grafit pensil banyak digunakan dalam penelitian biosensor voltametri karena sensitivitas yang baik dalam mendeteksi oksidasi asam nukleat, inert, dan juga harga elektrode grafit pensil yang relatif murah.

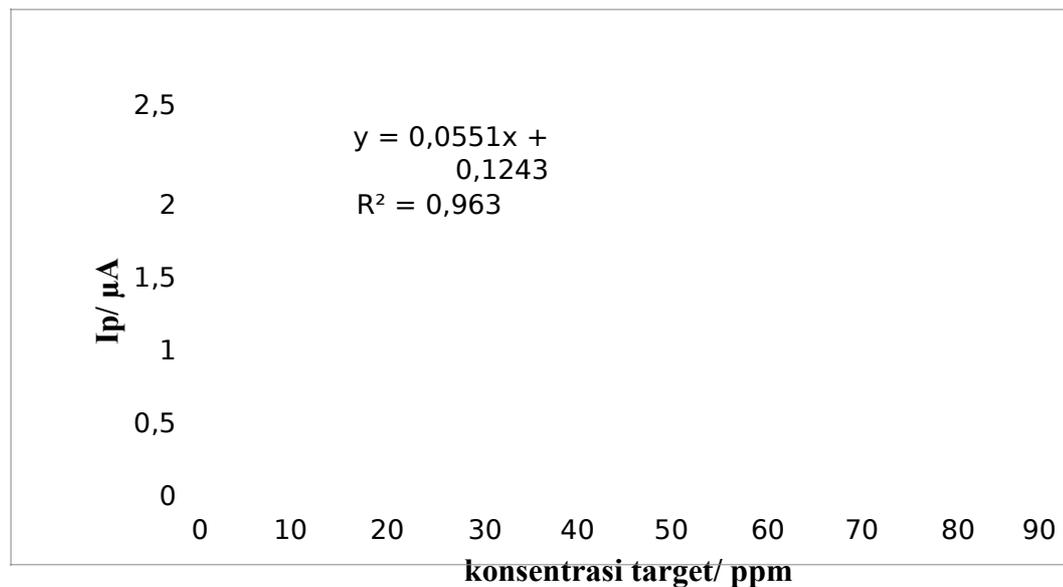
Elektrode grafit pensil diaktivasi atau di-*pretreatment* terlebih dahulu sebelum diamobilisasi *probe* atau target sintesis. Aktivasi EGP dilakukan dengan cara pemberian potensial untuk meningkatkan daya adsorpsi. Potensial yang diberikan dapat meningkatkan daya adsorpsi melalui ikatan elektrostatis antara permukaan karbon bermuatan positif dan gugus fosfat pada DNA yang bermuatan negatif. Amobilisasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah amobilisasi adsorpsi karena metodenya yang mudah, cepat dan sederhana.

Pada Gambar 4.4 dapat dilihat bahwa puncak oksidasi guanin berada pada potensial 0,7490 V dan 0,7550 V. Pada elektrode karbon, basa guanin pada untai DNA teroksidasi pada rentang 0,8-1,0 V. Guanin teroksidasi diluar rentang potensial 0,8-1,0 dikarenakan perbedaan kondisi percobaan seperti suhu ruang yang tidak stabil. Pada *probe* tidak dihasilkan puncak oksidasi guanin. Hal ini dikarenakan guanin pada *probe* telah digantikan oleh inosin yang tidak memberikan respon kimia berupa sinyal oksidasi. Sehingga pada saat hibridisasi *probe*-DNA target hanya sinyal oksidasi guanin target yang terdeteksi. Dengan demikian, sinyal guanin merupakan indikator internal dalam penelitian ini.

Pada DNA target dihasilkan arus puncak oksidasi guanin sebesar 3,80 μ A sedangkan arus puncak pada *probe*-DNA target sebesar 1,50 μ A. Arus puncak yang dihasilkan dari hibridisasi *probe*-DNA target lebih rendah dibandingkan arus puncak DNA target karena pada hibridisasi *probe*-DNA target terbentuk untai ganda DNA. DNA untai ganda (dsDNA) memberikan puncak oksidasi yang lebih rendah daripada DNA target sintesis yang berbentuk DNA untai tunggal. Basa nitrogen dalam dsDNA seolah-olah tersembunyi ke dalam heliks dan kekakuan struktur ini menyebabkan basa nitrogen jauh dari permukaan elektrode. Sehingga proses oksidasi menjadi terhambat (Alvarez *et al.*, 2004).

4.5 Optimasi Konsentrasi DNA target

Optimasi konsentrasi DNA target dilakukan dengan pengukuran sinyal oksidasi guanin hasil hibridisasi *probe*-DNA target sintesis pada variasi konsentrasi. Target sintesis yang digunakan 0, 20, 30, 40, 60, dan 80 ppm (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Kurva sinyal oksidasi guanin terhadap konsentrasi DNA target sintesis. Konsentrasi *probe* yang digunakan 20 ppm, dengan waktu amobilisasi dan hibridisasi masing-masing 20 menit.

Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum yaitu konsentrasi *probe* 20 ppm, waktu amobilisasi 20 menit, waktu hibridisasi 20 menit, amplitudo pulsa 50 mV, *scan rate* 20 mV/s, dan potensial yang diberikan 0,4-1,4 V. Pada kurva optimasi konsentrasi DNA target (Gambar 4.5) menunjukkan bahwa sinyal oksidasi guanin meningkat secara linier dengan bertambahnya konsentrasi DNA target dari 20 ppm hingga 40 ppm. Arus puncak paling tinggi dihasilkan pada konsentrasi DNA target 40 ppm. Pada konsentrasi DNA target 60 ppm dan 80 ppm arus puncak yang dihasilkan semakin menurun. Oleh karena itu, konsentrasi DNA target 40 ppm digunakan sebagai konsentrasi optimum DNA target pada saat hibridisasi *probe* dengan sampel ampikon *nested* PCR. Dari hasil

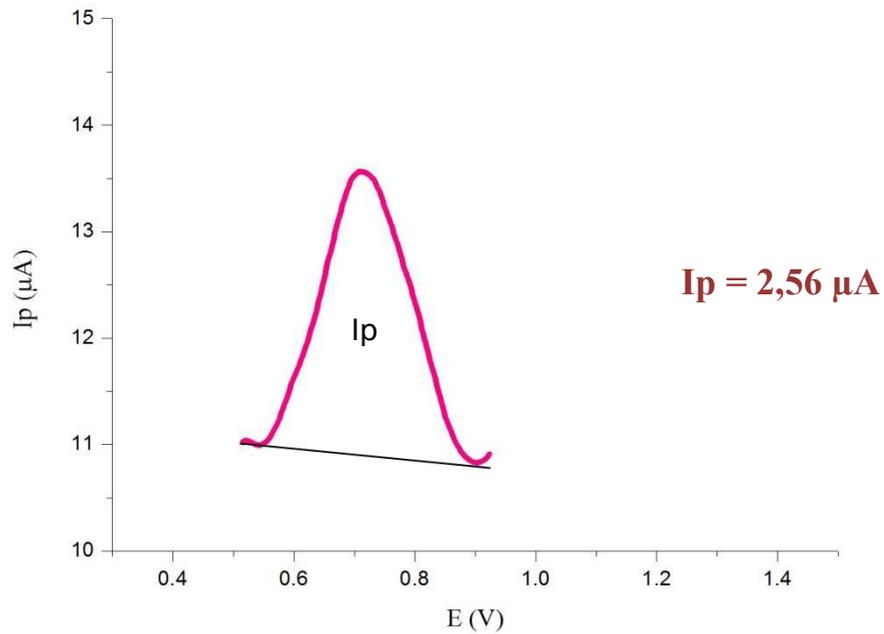
perhitungan didapatkan persamaan regresi linier: $y = 0,0551x + 0,1243$ dan koefisien korelasi sebesar 0,9813. Limit deteksi yang diperoleh sebesar 0,4897 ppm. Perhitungan ditunjukkan pada Lampiran 5.

4.6 Pengukuran Sinyal Oksidasi Guanin Amplikon *nested* PCR gen *flagellin S. typhi*

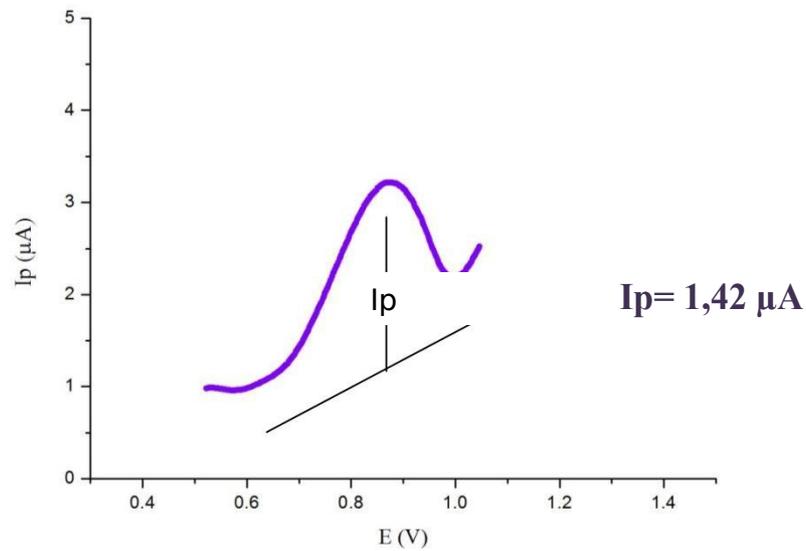
Probe teramobilkan pada EGP kemudian dihibridisasikan dengan amplikon gen *flagellin S. typhi* menggunakan waktu amobilisasi dan hibridisasi optimum masing-masing selama 20 menit. Sebelum dilakukan hibridisasi, amplikon gen *flagellin S. typhi* yang berbentuk untai ganda didenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit untuk memutuskan ikatan hidrogen sehingga diperoleh untai tunggal amplikon gen *flagellin S. typhi*. Setelah didenaturasi, amplikon gen *flagellin S. typhi* didinginkan dalam penangas es selama 2 menit untuk mencegah terjadinya renaturasi (Kerman *et al.*, 2004).

Probe diamobilisasi pada permukaan EGP selama 20 menit lalu dicuci dengan 0,5M bufer asetat pH 5,0. Kemudian dilakukan hibridisasi antara *probe* dan amplikon gen *flagellin S. typhi* dengan cara mencelupkan EGP kedalam amplikon gen *flagellin S. typhi* 40 ppm selama 20 menit dan dilakukan pencucian dengan 0,5 M bufer fosfat pH 7,0. Pengukuran dilakukan pada potensial 0,4-1,4V.

Deteksi amplikon *nested* PCR gen *flagellin S. typhi* melalui pengukuran sinyal oksidasi guanin menggunakan voltametri pulsa diferensial (Gambar 4.6 dan Gambar 4.7).



Gambar 4.6 Voltamogram pulsa diferensial sinyal oksidasi guanin hasil hibridasi *probe*-amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* pada kondisi optimum menggunakan elektrode grafit pensil (EGP).



Gambar 4.7 Voltamogram pulsa diferensial sinyal oksidasi guanin hasil hibridasi *probe*-amplikon *second round* PCR gen *flagellin S. typhi* pada kondisi optimum menggunakan elektrode grafit pensil (EGP).

Pada voltamogram hasil pengukuran ke-1 sinyal oksidasi guanin dari hibridisasi *probe*-amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* (Gambar 4.6), dihasilkan arus puncak sinyal oksidasi guanin sebesar 2,56 μA berada pada potensial 0,7153 V. Sampel yang berada pada rentang potensial 0,70-0,90 V menunjukkan proses hibridisasi telah terjadi. Probe yang sebelumnya tidak memberikan sinyal oksidasi pada potensial sekitar 0,7-0,9 V, setelah berikatan dengan amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* menghasilkan sinyal oksidasi guanin target. Dengan demikian, produk *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* yang pada awalnya tidak terdeteksi oleh elektroforesis gel agarosa dengan menggunakan metode biosensor voltametri dapat terdeteksi.

Pada voltamogram hasil pengukuran ke-1 hibridisasi *probe* dan amplikon *second round* PCR gen *flagellin S. typhi* (Gambar 4.7) dihasilkan arus puncak pada potensial 0,8641 V sebesar 1,42 μA . Hasil hibridisasi *probe*-amplikon *second round* PCR *S. typhi* menghasilkan sinyal oksidasi guanin pada potensial 0,7-0,9 V menunjukkan gen *flagellin S. typhi* dapat terdeteksi dengan metode biosensor voltametri.

Pada pengukuran ke-2, dihasilkan sinyal oksidasi guanin pada daerah potensial yang berbeda, sehingga pengukuran ke-1 dan ke-2 sulit ditunjukkan dalam satu voltamogram yang sama. Perbedaan potensial dari puncak arus pada pengukuran ke-1 dan ke-2 disajikan dalam (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Data hasil pengukuran sinyal hibridisasi *probe*-amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi*.

Pengukuran ke-	Potensial (V)	Ip (μA)	Ip rata-rata (μA)	Simpangan Baku
1	0,7153	2,56	2,32	0,3323
2	0,8562	2,09		

Tabel 4.3 Data hasil pengukuran sinyal hibridisasi *probe*-amplikon *second round* PCR gen *flagellin S. typhi*

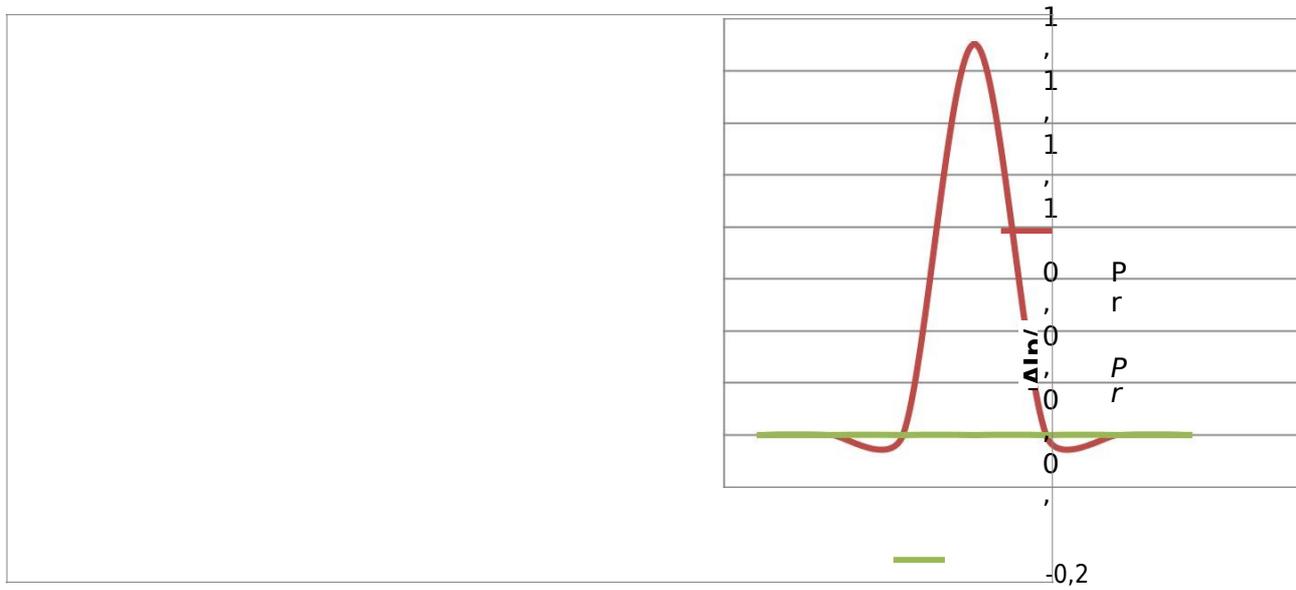
Pengukuran ke-	Potensial (V)	Ip (μ A)	Ip rata-rata (μ A)	Simpangan Baku
1	0,8641	1,42	1,47	0,0707
2	0,7134	1,52		

Dari pengukuran sinyal oksidasi hasil hibridisasi *probe* dengan amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* dengan dua kali pengulangan, diperoleh rata-rata arus puncak oksidasi sebesar 2,32 μ A. Sedangkan pada *second round* PCR diperoleh rata-rata arus puncak oksidasi sebesar 1,47 μ A.

Pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 terlihat bahwa dari dua kali pengukuran diperoleh arus puncak pada potensial yang berbeda. Puncak arus yang berbeda ini disebabkan oleh berubahnya kondisi pengukuran misalnya pH larutan bufer dan suhu ruangan yang berubah pada saat pengukuran. Menurut Hartati (2009), bahwa pH larutan mempengaruhi baik potensial puncak oksidasi guanin maupun adenin. Bertambahnya pH larutan akan menurunkan potensial puncak oksidasi guanin. Dalam penelitian ini, terjadi penurunan pH larutan bufer sehingga mengakibatkan potensial arus bergeser sedikit ke arah kiri (potensial arus oksidasi berkurang). Penyebab penurunan pH tersebut mungkin dikarenakan suhu larutan buffer yang digunakan pada pengukuran secara VPD belum stabil secara sempurna. Suhu larutan tersebut belum setara dengan suhu ruang karena sebelumnya buffer berada dalam penyimpanan yang cukup lama di dalam lemari pendingin.

4.7 Pengukuran Sinyal Hibridisasi *Probe* dengan DNA non-komplemen

Pengukuran sinyal hibridisasi *probe*-DNA target dibandingkan dengan sinyal hibridisasi *probe*-DNA non komplemen (Gambar 4.8).



Gambar 4.8
V
ot
a
m
o
gr
a
m
si
n
ya
l
hi
br
id
is
as
i
pr

o
b
e-
D
N
A
ta
rg
et
da
n
si
n
ya
l
hi
br
id
is
as
i
pr
o
b
e-
D
N
A
n
o
n-
k
o
m
pl
e
m

en

.

P

ro

b

e

ya

ng

di

a

m

ob

ili

sa

si

pa

da

pe

r

m

uk

aa

n

el

ek

tr

od

e

m

en

ge

na

l

ur

ut

an
ba
sa
ko
m
pl
e
m
en
D
N
A
ta
rg
et
ke
m
ud
ia
n
m
e
m
be
nt
uk
hi
br
id
a.
Id
en
tif
ik
as
i

in
i
sp
es
ifi
k
m
en
un
ju
kk
an
ad
an
ya
ur
ut
an
ko
m
pl
e
m
en
at
au
no
n-
ko
m
pl
e
m
en
.
K

eti
ka
ur
ut
an
D
N
A
ta
rg
et
se
su
ai
de
ng
an
pr
o
b
e
m
ak
a
hi
br
id
a
te
rb
en
tu
k
(p
ro
b

e-
D
N
A
ta
rg
et
).

P

ad
a
(
G
a
m
ba
r
4.

8)

si
ny
al
hi
br
id

is
as
i

pr

o

b

e-

D

N

A

no

n
ko
m
pl
e
m
en
ti
da
k
di
ha
sil
ka
n
pa
da
re
nt
an
g
0,
7-
0,
9
V.
In
i
m
en
un
ju
kk
an
sp
es

ifi
sit
as
ya
ng
ba
ik
ka
re
na
bi
os
en
so
r
vo
lta
m
m
et
ri
da
pa
t
m
e
m
be
da
ka
n
D
N
A
ta
rg

et
ya
ng
ko
m
pl
e
m
en
da
n
D
N
A
ta
rg
et
ya
ng
no
n-
ko
m
pl
e
m
en
.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

Metode *nested* PCR-biosensor voltammetri pulsa diferensial dengan menggunakan elektrode grafit pensil dapat digunakan untuk mendeteksi fragmen gen *flagellin S. typhi*. Sinyal oksidasi guanin hasil hibridisasi antara DNA *probe*-amplikon *first round* PCR gen *flagellin S. typhi* menunjukkan arus puncak rata-rata sebesar 2,32 μA . Hasil hibridisasi DNA *probe*-amplikon *second round* PCR sebesar 1,47 μA . Pengukuran sinyal oksidasi guanin dengan variasi konsentrasi DNA target sintesis menggunakan elektrode grafit pensil memberikan rentang linieritas pada konsentrasi 20 sampai 40 ppm. Koefisien korelasi yang didapatkan sebesar 0,9813 dan limit deteksi sebesar 0,4897 ppm.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk melakukan pengukuran sinyal oksidasi hasil hibridisasi DNA *probe* dengan sampel yang mengandung urutan komplemen dan non-komplemen dalam perbandingan yang sama untuk mengetahui spesifisitas dari DNA *probe* tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, P. L. S., M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres & P. Tunon-Blanco. 2004. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanalysis*. **16**, 1193-1204.
- Anitei, S. 2006. *Typhoid Bacterium Accompanied Us Along Our Evolution*. <http://news.softpedia.com/news/Typhoid-Bacterium-Accompanied-Us-Along-Our-Evolution-41046.shtml>. Diakses pada tanggal 5 Oktober 2011.
- Bassett, J., R.C. Denney, G.H. Jeffery & J. Mendham. 1994. *Vogel : Buku Ajar Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, diterjemahkan oleh A.H. Pudjaatmaka & L. Soetiono. Edisi Keempat. EGC. Jakarta.
- Bianchi, Z. 2010. The Polymerase Chain Reaction and its Uses. <http://suite101.com/article/the-polymerase-chain-reaction-and-its-uses-a258356>.
- Brabec, V & G. Dryhurst. 1978. Electrochemical oxidation of polyadenilic acid at graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **91**, 219-229.
- Brown, T. A. 2002. *Genomes*, Second Editions. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Drummond, T. G., M. G. Hill, & J. K. Barton. 2003. Electrochemical DNA sensors. *Review Nature Biotechnology. Nature Publishing Group.* **21**, 1192-1199.
- Edelman, R., & M. M. Levine. 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 329-349.
- Erdem, A., M. I. Pividori, M. del Valle, S.. Alegret. 2004. Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing. *Electroanalytical Chemistry. Elsevier.* **567**, 29-37.
- Hartati, W.H. 2010. *Biosensor Elektrokimia Untuk Deteksi Urutan Spesifik DNA*. Unpad Press. Bandung.
- Hatta, M & H. L. Smits. 2007. Detection *Salmonella typhi* by nested polymerase chain reaction in blood, urine and stools samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **76**, 139-143.

- Hendarta, D. S. 2011. *Demam Tifoid*. <http://medicine.uui.ac.id/index.php/Artikel/Demam-Tifoid.html>. Diakses pada tanggal 27 November 2011.
- Hoffman, S. L. 1991. *Typhoid Fever*. Dalam : Strickland GT, Ed. Hunter's Textbook of Pediatrics, edisi 7. Philadelphia : WB Saunders, 1991:344-58.
- Kerman, K., D.Ozkan, P.Kara, H.Karadeniz, Z.Ozkan, A.Erdem, F.Jelen & M.Ozsoz. 2004. Electrochemical detection of specific DNA sequences from PCR amplicons on carbon and mercury electrodes using methylol blue as an intercalator. *Turk J. Chem.* **28**, 523-533.
- Keusgen, M. 2002. Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften. Springer-Verlag.* **89**, 433-444.
- Khabibah, N. 2009. Beberapa tipe teknik PCR. <http://nurkhabibah.blogspot.com/2009/05/beberapa-tipe-teknik-pcr.html>.
- Kumar, A. & R. Gupta. 2005. ***Environmental Endocrine Disrupters and Human Health***. <http://www.iitk.ac.in/infocell/iitk/newhtml/storyoftheweek55.htm>. Di akses pada tanggal 2 Desember 2011.
- Mahmuddin. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. <http://mahmuddin.wordpress.com/2010/08/31/polymerase-chain-reaction-pcr/>. Diakses pada tanggal 6 November 2011.
- Marhamah. 2009. *Evaluasi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Demam Tifoid Dewasa Di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit Umum Daerah Pambalah Batung Kabupaten Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan*. <http://etd.eprints.ums.ac.id/10144/1/K100060218.pdf>. Diakses pada tanggal 5 Oktober 2011.
- McCreery, R. L. & K. K. Cline. 1996. *Carbon Electrode*, dalam Kissinger, P. T. & Heineman, W. R., Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Neidle, S. 1999. *DNA Structure and Recognition*; IRL Press, Oxford University Press. Oxford.
- Nurmalasari, R. 2011. Studi PCR-Biosensor DNA Voltametri Terhadap Fragmen Gen *carA Salmonella typhi* dari Sampel Darah Penderita Demam Tifoid. Skripsi Sarjana. FMIPA. Universitas Padjadjaran.

- Palecek, E., M. Fojta, M. Tomschik & J. Wang. 1998. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosens. Bioelectron.* **13**, 577-587.
- Pang, T. 1992. Typhoid Fever: A Continuing Problem. *World Scientific*, 1992:1-2.
- Pawitro U.E., M. Noorvitry & W. Darmowandowo. 2002. *Ilmu penyakit anak : diagnosa dan penatalaksanaan*. Edisi 1. Jakarta : Salemba Medika. 1-43.
- Pedano, M.L. & G.Rivas. 2005. Adsorption and Elektrooxidation of Nucleid acids at Carbon Nanotubes Paste Electrodes. *Elects. Commun.* **6**, 10-16.
- Pelczar, Michael J. 1999. Microbiology. Mc Graw-Hill International Editions. USA.
- Prasetyo, R. V & Ismoedijanto. 2011. Metode Diagnostik Demam Tifoid pada Anak. www.pediatrik.com/buletin/06224114418-f53zji.doc. Diakses pada tanggal 6 September 2011.
- Protti, P. 2001. *AMEL Electrochemistry: Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques*. Fourth Edition. AMEL. New York.
- Rachmat, J. 2011. Demam Tifus dan Diagnosanya. <http://kampungiptek.blogspot.com/2011/02/demam-tifus-dan-diagnosanya.html>. Diakses pada tanggal 6 November 2011.
- Reekie, T. 2005. Evolutionary Relationships among Rust Fungi in the Genus *Melampsora*. <https://www.anbg.gov.au/cpbr/summer-scholarship/2005-projects/reekie-tristan-rust/index.html>.
- Riezakirah. 2011. Typhus. <http://riezakirah.wordpress.com/2011/01/15/typhus/>. Diakses pada tanggal 2 Desember 2011.
- Rivas, G., M. L. Pedano & N. Ferreyra. 2005. Electrochemical biosensor for sequence-specific DNA detection. *Anal. Letters.* **38**, 2653–2703.
- Sayati & S. Wardiyati. 2007. Aplikasi Voltametri Untuk Penentuan Logam Berat Dalam bahan Lingkungan. <http://isjd.pdi.lipi.go.id/admin/jurnal/Edkhususdes08265270.pdf>. Diakses pada tanggal 2 Desember 2011.

- Suharsono. 2010. *Struktur dan Ekspresi Gen*.
<http://www.tpb.ipb.ac.id/files/materi/genetika/strukturekspresi/strukturtextpdf.pdf>.
- Sutisna, E.M. 2010. DNA dan RNA Genom.
<http://emelizabiologi.blogspot.com/2010/10/dna-dan-rna-genom.html>
- Skoog, D.A., D. M. West & F.T. Holler. 1996. *Fundamental of Analytical Chemistry*. Sounder College Publishing. Tokyo.
- Song, J.H., H.Cho, M.Y.Park, D.S.Na, & H.E.Moon. 1993. Detection of *Salmonella typhi* in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. *Journal Of Clinical Microbiology*, June 1993, p. 1439-1443.
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase chain reaction (PCR): era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi*. *Biomedis*. **1**, 1-9.
- Todar, K. 2011. *Salmonella typhi*. <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html>.
 Diakses pada tanggal 5 Oktober 2011.
- Toha, A. H. A. 2001. *Deoxyribo Nucleic Acid : Keanekaragaman, Ekspresi, Rekayasa, dan Efek Pemanfaatannya*. Alfabeta. Bandung
- Tumbelaka, A. R. 2005. *Tata laksana terkini demam tifoid pada anak*. *Simposium Infeksi – Pediatri Tropik dan Gawat Darurat pada Anak*. IDAI Cabang Jawa Timur. Malang : IDAI Jawa Timur, hal.37-50.
- Wanenoer. 2011. *Salmonella typhi dan Demam Tifoid*.
<http://id.shvoong.com/exact-sciences/biology/2111494-salmonella-typhi-dan-demam-tifoid/>. Diakses pada tanggal 2 Desember 2011.
- Wang, J. 2002. Review Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta. Elsevier Science*. **469**, 63-71.
- Wang, J., G. Rivas & X. Cai. 1997. Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the *Eschericia coli* pathogen. *Electroanalysis*. **9**, 395-398.
- Zhenxin, W., L. Dianjun & D. Shaojun. 2000. Study on adsorption and oxidation of calf thymus DNA at glassy carbon electrode. *Electroanalysis. Wiley-VCH*. **12**, 1419-1421.

LAMPIRAN 1

EVALUASI KEMAJUAN PENELITIAN

1. CAPAIAN

a. Tujuan yang tertulis di proposal:

- 1). Studi teknologi genosensor untuk diagnosis
- 2). Mengembangkan metode elektroanalisis untuk deteksi bakteri patogen dalam sampel darah.

Tahapan penelitian:

1. Persiapan bahan kimia dan peralatan
2. Studi keseluruhan sinyal adenin dan guanin
3. Studi hibridisasi probe-target standar *S. typhi*
4. Studi selektivitas
5. Isolasi DNA dari bakteri *S. Typhi*
6. Studi hibridisasi probe-target DNA hasil isolasi
7. Isolasi DNA dari sampel darah
8. Amplifikasi PCR
9. Studi deteksi urutan DNA dari sampel darah

b. Tujuan yang telah dicapai:

- 1). Studi teknologi genosensor untuk diagnosis
- 2). Mengembangkan metode elektroanalisis untuk deteksi bakteri patogen dalam sampel darah, dengan tahapan penelitian:
 1. Persiapan bahan kimia dan peralatan
 2. Studi keseluruhan sinyal adenin dan guanin
 3. Studi hibridisasi probe-target standar *S. typhi*
 4. Studi selektivitas

5. Isolasi DNA dari bakteri *S. Typhi*
6. Studi hibridisasi probe-target DNA hasil isolasi
7. Isolasi DNA dari sampel darah
8. Amplifikasi PCR
9. Studi deteksi urutan DNA dari sampel

darah **c. Tujuan yang belum dicapai:**

tidak ada

2. PRODUK RISET

Yang dijanjikan pada proposal		Yang dihasilkan pada penelitian	
Publikasi	Nasional	Publikasi	<p>1. Yeni Wahyuni Hartati, Shabarni Gaffar, Santhy Wyantuti, Siti Rochani. Biosensor Voltammetri Untuk Deteksi Urutan Spesifik DNA dari Amplikon PCR. SNKAI-HKI, Jakarta Convention Center, Mei 2012.</p> <p>2. Yeni Wahyuni Hartati*, Rini Surbakti, Nurul Auliany, Santhy Wyantuti, Shabarni Gaffar. Study of Nested PCR-Voltammetric DNA Biosensor related to <i>flagellin</i> Gene Fragment of Pathogenic <i>Salmonella typhi</i>. 1st International Conference of Indonesian Chemical Society, September 2012. Proceeding in progress.</p>
Prototipe	-	Prototipe	-
HAKI	-	HAKI	-

3. Kegiatan diseminasi hasil riset:

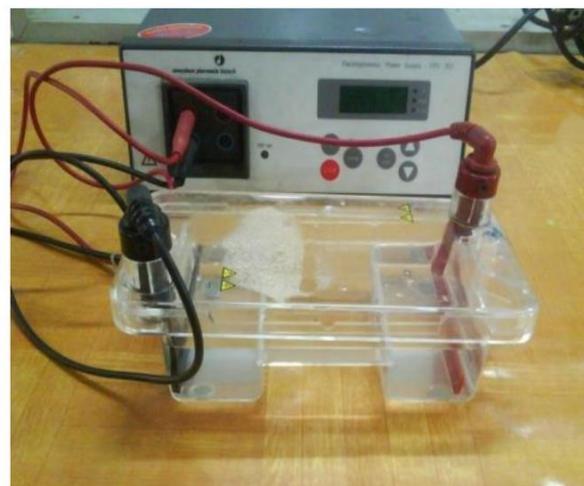
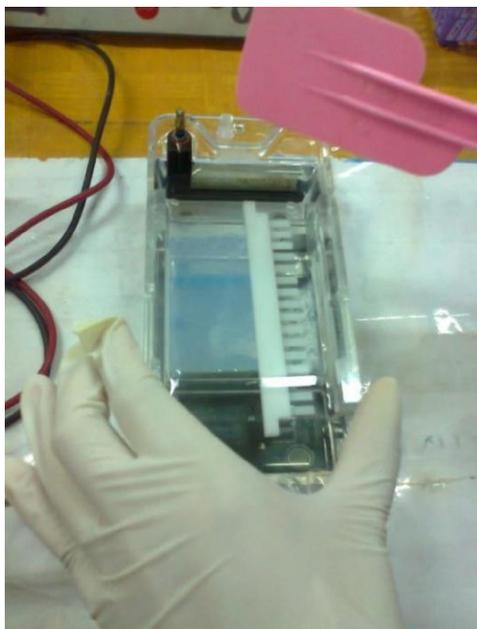
- a. Seminar Nasional Kimia Analitik dan Instrumentasi, Jakarta Convention Center, Mei 2012.
 - b. 1st International Conference of Indonesian Chemical Society, September 2012.
4. **Sinergi dengan kegiatan dan proyek riset lain:** tidak ada
 5. **Kemanfaatan proyek riset:** Penelitian ini merupakan bagian dari topik S3 peneliti utama dengan judul “Pengaruh kombinasi manipulasi genetik terhadap tingkat sekresi α -amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 dalam *Pichia pastoris*”, dan sudah lulus pada tanggal 7 juli 2011. Penelitian ini melibatkan dua mahasiswa S1.
 6. **Permasalahan yang dihadapi dan saran perbaikan:** tidak ada
 7. **Rencana kelanjutan penelitian:** Penelitian produksi α -amilase rekombinan oleh *P. pastoris* skala fermentasi.

LAMPIRAN 2

DOKUMENTASI PENELITIAN

Gambar L1: Kultur cair *S. typhi*

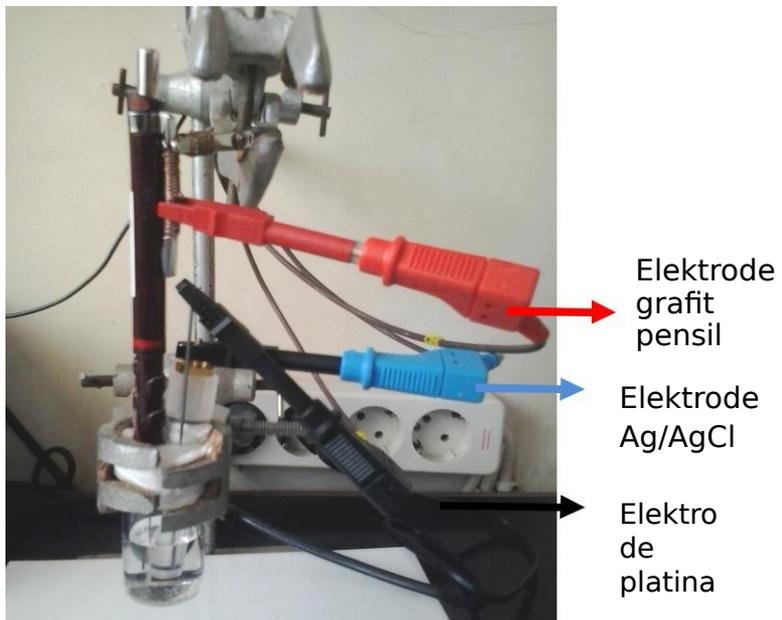
Gambar L2: PCR



Gambar L3: Elektroforesis



Gambar L.4 Potensiostat



Gambar L.5 Sel Voltammetri

LAMPIRAN 5

Personalia tenaga peneliti beserta kualifikasinya

Ketua Peneliti

IDENTITAS DIRI

Nama : Dr. Yeni Wahyuni Hartati, M.Si
 NIP : 19710924 199802 2 001
 Tempat dan Tanggal Lahir : Garut, 24 September 1971
 Jenis Kelamin : Laki-laki Perempuan
 Agama : Islam
 Golongan / Pangkat : III d/ Penata Tk I
 Jabatan Akademik : Lektor
 Perguruan Tinggi : Universitas Padjadjaran
 Alamat : Jl. Singaperbangsa No. 2 Bandung
 Telp./Faks. : 022-2507873
 Alamat Rumah : Jl. Merkuri Utara No. 8 Bandung
 Telp./Faks. : 022-7561080
 Alamat e-mail : yw_hartati@unpad.ac.id

RIWAYAT PENDIDIKAN PERGURUAN TINGGI

Tahun Lulus	Program Pendidikan(diploma, sarjana, magister, spesialis, dan doktor)	Perguruan Tinggi	Jurusan/ Program Studi
1996	Sarjana	UNPAD	KIMIA
1999	Magister	ITB	KIMIA
2009	Doktor	UNPAD	KIMIA

PELATIHAN PROFESIONAL

Tahun	Jenis Pelatihan(Dalam/ Luar Negeri)	Penyelenggara	Waktu
2011	Workshop Trend of Nanotechnology and Biomaterial	ITB-Groningen Univ	7-10 Nov 2011
2010	Pelatihan Paten	DIKTI-Kopertis	7-9 April 2010
2008	Penulisan karya Ilmiah	KIMIA-FMIPA	September

		UNPAD	2009
2008	DNA Biosensor devoted to clinical analysis. Analytical Chemistry Department	Ege University Turkey	April-May 2008

PENGALAMAN PENELITIAN			
Tahun	Judul Penelitian	Ketua/anggota Tim	Sumber Dana
2012	Pengembangan Biosensor DNA Secara Elektrokimia Tanpa Indikator Eksternal Untuk Deteksi Bakteri Patogenik Dalam Sampel Darah	Ketua	Hibah Bersaing
2010-2011	Pengembangan Biosensor DNA Tanpa Indikator Eksternal untuk Deteksi Mutasi Titik (<i>Point Mutation</i>) DNA Mitokondria pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2	Ketua	Hibah Bersaing DIKTI
2009-2010	Pengembangan Biosensor DNA Tanpa Indikator Eksternal untuk Deteksi Mutasi Titik (<i>Point Mutation</i>) DNA Mitokondria pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2	Ketua	Hibah Bersaing DIKTI
2008-2009	Studi Deteksi Urutan Spesifik DNA dan Mutasi Basa Tunggal pada Urutan DNA secara Biosensor DNA Voltammetri menggunakan Elektrode Grafit	Ketua	Hibah Penelitian Program Doktor, DIKTI

KARYA ILMIAH*

A. Buku/Bab Buku/Jurnal

Tahun	Judul	Penerbit/Jurnal
2010	Biosensor Elektrokimia Untuk Deteksi Urutan Spesifik DNA	Unpad Press
2009	Deteksi Urutan Pendek DNA <i>Salmonella Typhi</i> Berdasarkan Sinyal Guanin Target Secara Voltammetri	Jurnal Bionatura, Vol 11 No 3, November 2009

B. Makalah/Poster

Tahun	Judul	Penyelenggara
2012	Biosensor Voltammetri Untuk Deteksi Urutan Spesifik DNA dari Amplikon PCR	Seminar Nasional Kimia Analitik dan Instrumentasi, HKI, Jakarta Convention Center, Mei 2012
2012	Study of Nested PCR-Voltammetric DNA Biosensor related to <i>flagellin</i> Gene Fragment of Pathogenic <i>Salmonella typhi</i> .	1st International Conference of Indonesian Chemical Society, September 2012
2010	Single base mismatch detection on the mtDNA A3243G mutation using electrochemical DNA biosensor based based on target guanine signal	The third International Conference on Mathematics and Natural Sciences 2010, ITB
2010	Penentuan Kandungan Basa Guanin dan Adenin dalam Urutan DNA secara Voltammetri Menggunakan Elektrode Grafit Pensil	Seminar Nasional XIII Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia, Yogyakarta, 15 Juli 2010
2008	Electrochemical DNA hybridization sensors for sequences recognition on graphite electrodes	International Seminar on Chemistry, 2008 UNPAD
2008	Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the <i>Salmonella typhi</i>	The second International Conference on Mathematics and Natural Sciences 2008, ITB
2008	Single Base Mismatch Detection on the mtDNA A3243G Mutation Using DNA Biosensor Based on Meldola's Blue as the Hybridization Indicator	1 st Regional Conference on Biosensor and Biodiagnostics 2008, Kuala Lumpur, Malaysia
2008	Deteksi Hibridisasi DNA Secara Elektrokimia Pada Elektrode Pensil Grafit Dengan Interkalator Redoks-aktif <i>Meldola's Blue</i>	Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia SNHKI 2008

Bandung, Oktober 2012

(Dr. Yeni Wahyuni Hartati, M.Si)

Anggota Peneliti

Nama Lengkap : Santhy Wyantuti
Jenis Kelamin : Perempuan
NIP : 132 238 392
Pangkat / Jabatan : Penata Tk. I / Lektor
Tempat/Tanggal Lahir : Jakarta, Indonesia, 20 Oktober 1973
Bidang Keahlian : Kimia Analitik
Alamat Rumah : Griya Cinunuk Indah B1/4, Bandung 40624
 Jawa Barat Indonesia. Telepon 0062-22-7806944
Email : shanty.wyantuti@unpad.ac.id
Alamat Kantor : Jurusan Kimia, Universitas Padjadjaran
 Jl. Raya Bandung-Sumedang Km.21 Jatinangor
 45363 Jawa Barat Indonesia.
 Telepon 0062-22-7794391 Fax 7794391
 Jl. Singaperbangsa No. 2 Bandung 40133
 Indonesia Telepon 0062-22-2507873
Pendidikan : a. S1 Jurusan Kimia FMIPA Unpad, 1997
 b. S2 Program Studi Kimia Analitik, Unpad, 2006
Pengalaman Penelitian :

- a. Hidrolisis Trigliserida yang Mengandung Asam Lemak Omega 3 EPA dan DHA dari Minyak Ikan Lemuru dengan Bantuan Enzim Lipase *Aspergillus niger*. Skripsi. Unpad. 1997.
- b. Penentuan Ziram (Fungisida Ditiokarbamat) secara Voltametri Pemapasan Anode Pulsa Diferensial dengan elektrode HMDE. Tesis Magister. Unpad. 2006.
- c. Pengaruh Penyimpanan dan Penggunaan Berulang Enzim Glukosa Isomerase Amobil dari *Aspergillus Orizae*. DIK. Lembaga Penelitian Unpad.2002.
- d. Karakterisasi Oksida $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ yang Diasamkan. DIPA. Lembaga Penelitian Unpad.2005.
- e. Konversi $\text{Ba}_2\text{Bi}_4\text{Ti}_5\text{O}_{18}$ menjadi Bentuk Asamnya dan Aplikasinya sebagai Katalis. DIPA. Lembaga Penelitian Unpad. 2009

Publikasi :

Analisis Pengaruh Urea Terhadap Kestabilan Kompleks Humat-Besi pada Lapisan Tanah. Bionatura.2001.

Deteksi Urutan Pendek DNA *Salmonella Typhi* berdasarkan Sinyal Guanin Target secara Voltametri. Bionatura.2009

Bandung, 20 Maret 2011

(Santhy Wyantuti)

Anggota Peneliti

Nama : Dr. Shabarni Gaffar, MSi
 Tempat dan Tanggal Lahir : Bukittinggi, 25 April 1971
 Alamat Kantor : Jurusan Kimia FMIPA, UNPAD
 Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor
 45363, Telp. 022-7794391, Fax. 022-7794391
 E mail : sabarni.ghafar@unpad.ac.id

Pendidikan/Kursus

No.	Perguruan Tinggi	Gelar	Tahun Lulus	Bidang Studi
1.	Universitas Padjadjaran	Dr	2011	Biokimia
2.	Institut Teknologi Bandung	M.Si.	1998	Kimia
3.	Universitas Andalas, Padang	S.Si.	1995	Kimia
4.	Asian Molecular Biology Organization (AMBO) International Training Course "Molecular Microbiology in Genome and Post-Genome Era" March 21-30, 2000, Osaka, Japan	-	2000	Biologi Molekul
5.	Carl Duisberg Gesellschaft e.V., Advanced Professional Training in Industrial Biotechnology, March-November 2001, Braunschweig, Germany,	-	2001	Biologi Molekul
6.	Groningen University, The Netherlands, Sandwich Program, DIKTI, October-December, 2009	-	2009	Biologi Molekul

Pengalaman kerja

Institusi	Jabatan	Periode kerja
Departemen Kimia, FMIPA, ITB	Asisten Laboratorium Biokimia	1997-1998
Kelompok Penelitian dan Pengembangan (dahulu PPAU)	Staf peneliti	1998-2004

Bioteknologi, ITB		
Sekolah Tinggi Farmasi Bandung (STFB)	Dosen Luar Biasa:	2002-sekarang
Universitas Padjadjaran	Dosen: Biokimia	2005-sekarang

Pengalaman Kerja Dalam Pengajaran

Kegiatan Pendidikan dan Pengajaran	Program	Lembaga
Kimia Dasar	(S1)	Jurusan Kimia UNPAD
Biokimia	(D3)	Jurusan Kimia UNPAD
Biokimia I	(S1)	Jurusan Kimia UNPAD
Biokimia II	(S1)	Jurusan Kimia UNPAD
Teknik Penelitian Biokimia	(S1)	Jurusan Kimia UNPAD
Biokimia Umum	(S1)	STFB
Bioteknologi Farmasi	(S1)	STFB

5.1.3. Pengalaman Riset

PENGALAMAN RISET				
No.	Judul Penelitian	Tahun	Sumber dana	Keterangan
1.	Varian Normal Urutan DNA Mitokondria Manusia Indonesia dan Produk Translasinya	1997-1999	Hibah Pasca	Mahasiswa peneliti
2.	Identifikasi Bakteri Termofilik di Indonesia Melalui Sekuensing Gen 16S rRNA	1999-2000	The Department for International Development (DFID, UK)	Asisten peneliti
3.	Identification of Coastal and Marine Organisms used as Traditional Medicine in Indonesia using 18s rRNA Sequences	2004-2005	International Toray Science Fondation	Peneliti utama

4.	Peningkatan sekresi α -amilase melalui manipulasi peptida sinyal dalam <i>Pichia pastoris</i>	2006-2007	Hibah Bersaing DIKTI	Peneliti Utama
5.	Isolasi dan karakterisasi gen pengode fruktosil transferase dari bakteri asam laktat susu fermentasi di Kabupaten Garut.	2006	DIPA UNPAD	Anggota peneliti
6.	Penambahan faktor pelipatan protein (PDI1) untuk meningkatkan sekresi α -amilase dalam <i>Pichia pastoris</i>	2009-sekarang	Hibah Bersaing DIKTI	Peneliti Utama
7.	Peningkatan produksi α -amilase melalui kombinasi manipulasi genetik dalam <i>Pichia pastoris</i>	2009	Hibah Penelitian Doktor	Peneliti Utama

Publikasi:

- Shabarni-Gaffar**, Natalia, D., Moeis, M.R., Suprijana, O., and Soemitro, S. **2008**. Signal Peptide Modification of α -amylase Gene (*ALPI*) and construction of pPICZA-MSALPI plasmid for improving secretory production of α -amilase in *Pichia pastoris*, Proceeding International Seminar on Chemistry, Bandung, Indonesia.
- Shabarni-Gaffar**, Hardjito, L., and Sriatimah, E. **2009**. Phylogenetics analysis of marine and coastal species using 18S rRNA sequence. *Bionatura, UNPAD, vol. 11, no.2*, 117-128.
- Hartati, Y.W., S. Rochani, H. H. Bahti, M. Agma, Shabarni-Gaffar. 2009. Deteksi urutan pendek DNA *Salmonella Typhi* berdasarkan sinyal guanin target secara voltametri. *Bionatura UNPAD, vol. 11, no.2*.
- Baker G. C., **Shabarni-Gaffar**., Cowon D. C., Suharto A. R. **2001**. Microbial community analysis of Indonesian hot-springs. *FEMS Microbiol. Lett.*: 103-109.
- Rachmayanti, R., **Shabarni-Gaffar**, Puspasari, F., Rahardjo, J.T., Atiemah, E.S., Hernawan, T., Arbianto, P., dan Noer A.S., (2001), Analisis Variasi Fragmen 0,4 kb Daerah D-loop DNA Mitokondria Manusia dari Suku Sunda di

Indonesia, *Kongres dan Simposium Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI)*, Juli 2001, Bogor, Indonesia.

Ratnayani, K., Noer, A. S., **Shabarni-Gaffar**, Puspasari, F., Rachmayanti, R., dan Atiemah, E.S. **2001**. 15 Jenis Varian Normal Ditemukan pada Gen ND4 dan ND5 DNA Mitokondria 10 Individu Indonesia, *Kongres dan Simposium Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI)*, Juli 2001, Bogor, Indonesia

Rachmayanti, R., **Shabarni-Gaffar**, Puspasari, F., Rahardjo, J.T., Atiemah, E.S., Hernawan, T., Arbianto, P., dan Noer A.S. **2000**. Analisis Homologi Urutan 9746 pb Nukleotida D-loop DNA Mitokondria 22 Individu Indonesia: 2 Keluarga (3 Generasi) dan 10 Individu yang tidak Mempunyai Hubungan Keluarga, *Prosiding Seminar Kimia Bersama ITB-UKM IV*, Yogyakarta, Indonesia

Shabarni-Gaffar. 1998. Varian Normal Urutan Nukleotida Fragment 0.4 kb Daerah D-loop DNA mitokondria Manusia Indonesia, *Thesis Magister*, Institut Teknologi Bandung.

Buku:

1. Shabarni-Gaffar. **2010**. Produksi protein rekombinan dalam sistem ekspresi *Pichia pastoris*, UNPAD Press. ISBN: 978-602-8743-23-5
2. Shabarni-Gaffar. **2010**. Bioteknologi molekul. Widia Padjadjaran. ISBN: 978-602-8323-46-8.

Bandung, November 2011

Dr. Shabarni Gaffar, M.Si