

SKRIPSI
DETEKSI GEN *ICSA* PADA BALITA PENDERITA DIARE DENGAN
METODE *POLYMERSE CHAIN REACTION* (PCR)



Diajukan Sebagai Syarat Meraih Sarjana Terapan Kesehatan (S.Tr.Kes) pada Program
Studi Diploma Empat (D-IV) Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Teknologi
Kesehatan Universitas Megarezky Makassar

ELFA ANDRIANI
B1D123082

PROGRAM STUDI D-IV TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
FAKULTAS TEKNOLOGI KESEHATAN
UNIVERSITAS MEGAREZKY
MAKASSAR

2025

HALAMAN JUDUL

**DETEKSI GEN *ICSA* PADA BALITA PENDERITA DIARE DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

***DETECTION OF THE ICSA GENE IN TODDLERS WITH DIARRHEA
USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD***

**Elfa Andriani
B1D123082**

Dibimbing oleh

(Nurfitri Arfani, S.Si., M.Si)
Pembimbing I

(Prof. Dr. Dra. apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si)
Pembimbing II

(Indas Wari Rahman, S.Si., M.Kes)
Penguji

**PROGRAM STUDI D-IV TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
FAKULTAS TEKNOLOGI KESEHATAN
UNIVERSITAS MEGAREZKY
MAKASSAR
2025**

HALAMAN PENGESAHAN

DETEKSI GEN *JCSA* PADA BALITA PENDERITA DIARE DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Disusun dan diajukan oleh
ELFA ANDRIANI

Nomor Induk Mahasiswa B1D123082

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi

Pada tanggal 24 Juli 2025

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Tim Penguji

Tanda Tangan

1. Nurfitri Arfani, S.Si., M.Si (.....)
2. Prof. Dr. Dra. apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si (.....)
3. Indas Wari Rahman, S.Si., M.Kes (.....)

Mengetahui,

Dekan

Ketua Program Studi

Fakultas Teknologi Kesehatan

D-IV Teknologi Laboratorium Medis



Prof. Dr. Dra. apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si.
NUPTK. 1350727628230013



Dr. Nirmawati Angria, S.Si., M.Kes.
NUPTK. 6950765666230332



**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT (LPPM)
UNIVERSITAS MEGAREZKY**

SK. Menristekdikti RI. No.1194/KPT/I/2018 Terakreditasi BAN PT

Kampus II . Jalan Antang Raya No. 43 Telp. 0411 - 492 491 - 496401 Fax. 496614 Website : <http://universitasmegarezky.ac.id> Email : info@universitasmegarezky.ac.id

KETERANGAN LOLOS UJI TURNITIN
No. 736 /T/07.091056/VII /2025

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Syamsyuriyana Sabar, S.Kep., Ns., M.Kep

NIDN : 0915118602

Jabatan : Ketua LPPM

Menyatakan bahwa :

Nama : Elfa Andriani

NIM : B1D123082

Prodi : DIV Teknologi Laboratorium Medis

Judul Skripsi/KTI : Deteksi Gen *IcsA* Pada Balita Penderita Diare Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Telah melalui uji *similarity* dengan software *Turnitin* dan dinyatakan lolos dengan persentase **28%** sesuai bukti terlampir.

Demikian Surat Keterangan ini di buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Makassar, 15 Juli 2025
Ketua,



Ns. Syamsyuriyana Sabar, M.Kep
NIDN: 09 151186 02

MOTTO

“Allah akan mengangkat derajat orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-rang yang diberi ilmu beberapa derajat”

(Al-Mujadilah: 11)

“Barang siapa menempuh jalan untuk mencari ilmu, Allah akan mudahkan baginya jalan menuju surga”

(HR. Muslim)

CURRICULUM VITAE



ELFA ANDRIANI

B1D123082

Program studi : DIV Teknologi Laboratorium Medis

Alamat : Antang Raya

Tempat/Tanggal Lahir: Eemokolo, 16 September 1999

Orang Tua

- a. Bapak : Jarmin
- b. Ibu : Maryana
- c. Alamat :Sangia Makmur, Kabupaten Bombana, Sulawesi Tenggara

Riwayat Pendidikan

- a. SD : SD Negeri Eemokolo
- b. SMP : SMP Negeri 15 Kabaena Utara
- c. SMA : SMK Negeri 07 Bombana
- d. DIII : Universitas Megarezky Makassar

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini yang berjudul:

“Deteksi Gen *IcsA* Pada Balita Penderita Diare Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*”.

Penyusunan karya tulis ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Sarjana Terapan Kesehatan pada program DIV Teknologi Laboratorium Medis (TLM), Fakultas Teknologi Kesehatan, Universitas Megarezky Makassar. Penulis menyadari bahwa tanpa bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak, karya tulis ini tidak akan dapat terselesaikan dengan baik.

Dengan penuh rasa hormat dan cinta, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua tercinta ayahanda **Jarmin** dan ibunda **Maryana**, yang senantiasa mendoakan, mendampingi, serta memberikan semangat, kasih sayang dan dukungan moril maupun materi tanpa henti. Tanpa keikhlasan dan doa dari ayah dan ibu, penyusunan Skripsi ini tidak akan pernah terwujud.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada:

1. **Bapak Dr. H. Alimuddin, SH., MH., M.Kn sebagai Pembina Yayasan Pendidikan Islam Mega Rezky Makassar**, atas arahan dan pembinaan yang senantiasa menjadi fondasi dalam pengembangan institusi dan mahasiswa.

2. **Ibu Alm. Hj. Suriyani SH., MH sebagai Pendiri Yayasan Pendidikan Islam Mega Rezky Makassar**, atas dedikasi dan kontribusi luar biasa dalam mendirikan lembaga pendidikan yang menjadi wadah pengembangan ilmu dan karakter
3. **Bapak Moch Noer Alim Qalby, SH., LLM sebagai Ketua Yayasan Pendidikan Islam Mega Rezky Makassar**, atas dukungan dan kebijakan strategis yang memfasilitasi proses pendidikan dan penelitian secara berkelanjutan.
4. **Bapak Prof. Dr. Anwar Ramli, SE., M.Si sebagai Rektor Universitas Megarezky**, atas motivasi dan arahnya dalam membangun budaya akademik yang unggul dan berdaya saing .
5. **Ibu Prof. Dr. Dra. apt. Asnah Marzuki, M.Si., sebagai Dekan Fakultas Teknologi Kesehatan Universitas Megarezky**, atas kesempatan dan dukungan yang diberikan selama masa studi.
6. **Ibu Dr. Nirmawati Angria, S.Si., M.Kes, sebagai Ketua Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis**, atas bimbingan akademik yang berkelanjutan dan inspiratif.
7. **Dosen Pembimbing Ibu Nurfitri Arfani, S.Si., M.Si., dan Ibu Prof. Dr. Dra. apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si.,** yang telah memberikan arahan, saran, dan evaluasi dalam penyusunan karya tulis ini dengan penuh kesabaran dan keikhlasan.
8. **Ibu Dr. Nirmawati Angria, S.Si., M.Kes, sebagai Pembimbing Akademik (PA)**, atas pendampingan dan bimbingan akademik selama masa studi

penulis.

9. **Seluruh dosen dan Staf Akademik Universitas Megarezky**, atas ilmu, perhatian, dan pelayanan yang diberikan selama proses studi.
10. ***Hasanuddin University Research Center (HUM-RC)***, atas izin, dukungan, dan kerja samanya selama pelaksanaan penelitian.
11. **Teman-teman seperjuangan dan semua pihak**, yang turut membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan karya ilmiah ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan karya ilmiah ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan karya ini di masa mendatang.

Akhir kata, semoga karya ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca, serta menjadi kontribusi yang berarti dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Juli 2025

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|--------------|
| HALAMAN JUDUL | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| KETERANGAN LOLOS TURNITIN | iv |
| MOTTO | v |
| CURRICULUM VITAE | vi |
| KATA PENGANTAR..... | vii |
| DAFTAR ISI..... | x |
| ABSTRAK..... | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xv |
| DAFTAR BAGAN | xvi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvii |
| DAFTAR SINGKATAN | xviii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Rumusan Masalah..... | 5 |
| C. Tujuan Penelitian | 5 |
| D. Manfaat Penelitian | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| A. Tinjauan Umum Diare | 7 |
| 1. Definisi Diare..... | 7 |
| 2. Epideomologi..... | 8 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Etiologi | 9 |
| 4. Patogenesis | 13 |
| 5. Klasifikasi Diare | 15 |
| 6. Cara Penularan | 16 |
| 7. Faktor Resiko | 17 |
| B. Tinjauan Umum <i>Shigella</i> | 19 |
| C. Tinjauan Umum Gen <i>IcsA</i> | 23 |
| D. Tinjauan Umum <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> | 26 |
| E. Kerangka Teori | 41 |
| F. Kerangka Konsep | 42 |
| G. Definisi Operasional | 42 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 43 |
| A. Jenis Penelitian | 43 |
| B. Waktu dan Tempat Penelitian | 43 |
| C. Populasi dan Sampel Penelitian | 43 |
| D. Kriteria Subjek Penelitian | 44 |
| E. Alat dan Bahan | 44 |
| F. Prosedur Kerja | 45 |
| G. Interpretasi Hasil | 49 |
| H. Analisis Data | 49 |
| I. Alur Penelitian | 50 |
| J. Etika Penelitian | 51 |
| BAB IV PEMBAHASAN | 52 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| A. Hasil Penelitian..... | 52 |
| B. Pembahasan..... | 52 |
| BAB V PENUTUP | 59 |
| A. Kesimpulan..... | 59 |
| B. Saran..... | 59 |
| DAFTAR PUSTAKA | 60 |
| LAMPIRAN | 63 |

ABSTRAK

Elfa Andriani, B1D1203802, Deteksi Gen *IcsA* Pada Balita Penderita Diare Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dibimbing oleh Nurfitri Arfani dan Asnah Marzuki.

Diare merupakan kondisi ketika seseorang mengalami peningkatan frekuensi buang air besar (lebih dari 3 kali dalam sehari) dengan konsistensi tinja yang lebih cair atau encer dan saat ini menjadi satu masalah kesehatan utama di Indonesia terutama pada anak-anak. Salah satu bakteri penyebab diare yang paling banyak ditemukan adalah *Shigella* sp. Bakteri ini terutama menyerang pada balita. Gen *IcsA* merupakan salah gen virulensi dari bakteri *Shigella* sp. yang berperan penting dalam menyebabkan diare. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *IcsA* pada penderita diare menggunakan metode PCR. Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif laboratorik. Sampel yang digunakan adalah feses balita penderita diare di RSUD Daya Kota Makassar sebanyak 13 sampel kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan gen *IcsA*. Hasil penelitian menunjukkan dari 13 sampel yang digunakan tidak ditemukan gen *IcsA* sebagai penanda keberadaan bakteri *Shigella* sp. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya pita pada ukuran 526 bp. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sampel feses balita penderita diare yang digunakan tidak disebabkan oleh bakteri *Shigella* sp.

Kata Kunci: Balita, Diare, *IcsA*, *Polymerase Chain Reaction*

ABSTRACT

Elfa Andriani, BID1203802, Detection of the IcsA Gene in Toddlers with Diarrhoea Using the Polymerase Chain Reaction (PCR) Method. Supervised by Nurfitri Arfani and Asnah Marzuki.

Diarrhoea is a condition where a person experiences increased frequency of bowel movements (more than 3 times a day) with a more liquid or watery stool consistency. It is currently a major health problem in Indonesia, especially among children. One of the most common bacteria causing diarrhoea is Shigella sp. This bacterium primarily affects toddlers. The IcsA gene is a virulence gene of Shigella sp. bacteria that plays a key role in causing diarrhoea. This study aims to detect the IcsA gene in diarrhoea patients using the PCR method. The type of research used in this study was a descriptive laboratory method. The samples used were 13 stool samples from toddlers with diarrhoea at Daya Hospital, Makassar City, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) examination with the IcsA gene. The results of the study showed that none of the 13 samples used detected the IcsA gene, a marker for the presence of Shigella sp. This was indicated by the absence of a band at 526 bp. Therefore, this study concluded that the stool samples used from toddlers with diarrhoea are not caused by Shigella sp.

Keywords: *Toddler, Diarrhoea, IcsA, Polymerase Chain Reaction*



DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Struktur Morfologi Bakteri <i>Shigella</i> sp..... | 20 |
| Gambar 2.2 Proses dan Komponen PCR | 33 |
| Gambar 6.1 Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen <i>IcsA</i> | 53 |

DAFTAR BAGAN

| | |
|---------------------------------|----|
| Bagan 2.1 Kerangka Teori | 41 |
| Bagan 2.2 Kerangka Konsep | 42 |
| Bagan 3.1 Alur Penelitian | 50 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 5.1 Surat Izin Pengambilan Sampel | 63 |
| Lampiran 5.3 <i>Informed Consent</i> | 65 |
| Lampiran 5.4 <i>Kuisisioner</i> | 66 |
| Lampiran 5.5 Surat Etik | 67 |
| Lampiran 5.6 Surat Keterangan Selesai Penelitian..... | 68 |
| Lampiran 5.7 Dokumentasi Penelitian..... | 69 |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|-------------------|---|
| ASI | : Air Susu Ibu |
| BAB | : Buang Air Besar |
| CDAD | : <i>Clostridium Difficile Associated Diarrhea</i> |
| DINKES | : Dinas Kesehatan |
| DNA | : <i>Deoksiribonuklet Acid</i> |
| dNTP | : <i>Deoksiribonukleotida trifosfat</i> |
| Hum-RC | : <i>Hasanuddin University Medical Research Centeri</i> |
| IcsA | : <i>Intracelluler Spread Gene A</i> |
| IpaJ | : <i>Invasion Plasmid Antigen J</i> |
| IpgD | : <i>Invasion Plasmid Gene D</i> |
| MD | : Mega Dalton |
| MgCl ₂ | : Magnesium Klorida |
| MPASi | : Makanan Pendamping Asi |
| OMA | : Otitis Media akut |
| PCR | : <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| pH | : <i>Potential of Hydrogen</i> |
| qPCR | : <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| RSUD | : Rumah Sakit Umum Daerah |
| WHO | : <i>World Health Organizat</i> |

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diare (*diarrheal disease*) berasal dari kata *diarroia* dalam Bahasa Yunani yang berarti mengalir terus, menggambarkan kondisi keluarnya feses secara berulang dengan tinja lebih cair dari biasanya. Secara klinis, diare didefinisikan sebagai buang air besar yang terjadi dalam jumlah tiga kali atau lebih dalam kurun waktu 24 jam, dengan tekstur tinja lebih cair atau encer. Umumnya penyakit disebabkan oleh infeksi mikroorganisme (Iqbal et al., 2022).

Penyakit diare merupakan salah satu penyakit infeksi pada saluran pencernaan yang hingga kini masih menjadi masalah kesehatan serius di dunia termasuk Indonesia. Diare memberikan dampak yang cukup besar terhadap angka kesakitan dan kematian terutama pada kelompok usia anak-anak. Berdasarkan laporan WHO dan UNICEF, setiap tahunnya diperkirakan terjadi 2 miliar kasus diare diseluruh dunia. Dari jumlah kasus tersebut, sekitar 1,9 juta anak balita meninggal dunia akibat penyakit ini. Kematian akibat diare ini sebagian besar yakni sekitar 78% terjadi di negara berkembang, terutama di wilayah Afrika dan Asia Tenggara. Data Riset Kesehatan Dasar tahun 2018 menunjukkan bahwa prevalensi diare untuk semua kelompok umur mencapai 8%. Sementara itu, pada kelompok balita angka prevalensinya lebih tinggi, yakni sekitar 12,3%, sedangkan pada bayi prevalensinya sebesar 10,6%. Selain itu, laporan dari *Sample Registration System* pada tahun 2018 juga

menunjukkan bahwa diare masih menjadi salah satu penyebab kematian, terutama pada bayi baru lahir (neonates) sebesar 7% dan bayi berusia 28 hari sebesar 6%. Data ini menegaskan bahwa diare masih menjadi tantangan besar bagi dunia kesehatan, khususnya dalam upaya menurunkan angka kematian bayi baru lahir dan balita (Kemenkes, 2023).

Di Sulawesi Selatan pada tahun 2020 jumlah kasus diare perkiraan mencapai sekitar 236.099 kasus. Namun dari total perkiraan tersebut, hanya sebanyak 28.228 kasus atau sekitar 11,96% yang tercatat telah mendapatkan penanganan. Kasus diare terbanyak terjadi di Kota Makassar, dimana jumlah kasus yang berhasil di tangani sebanyak 2.686 kasus dari 41.220 terget yang ada atau hanya sekitar 6,52% dengan jumlah penduduk Kota Makassar sebanyak 1.484.912 jiwa (Dinkes, 2021).

Diare merupakan salah satu penyakit yang dapat menyerang semua kelompok usia terutama balita. Penyakit ini menjadi salah satu penyebab kematian pada anak-anak usia dibawah 5 tahun, menempati posisi kedua sebagai penyebab kematian terbanyak pada balita di seluruh dunia termasuk Indonesia. Secara global, diare mengakibatkan sekitar 525.000 kematian pada balita setiap tahunnya dan sekitar 1,7 juta balita tercatat menderita diare setiap tahun. Anak-anak lebih rentan terkena diare disebabkan sistem kekebalan tubuh mereka yang masih belum berkembang secara optimal, sehingga mudah terinfeksi virus dan bakteri (Jannah et al., 2023).

Usia balita merupakan fase rentan bagi anak karena pada masa ini sistem kekebalan tubuh masih belum berkembang secara optimal, sehingga anak

lebih mudah terserang penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi pada kelompok usia ini adalah diare. Umumnya, diare disebabkan oleh infeksi bakteri, meskipun faktor penyebabnya dapat bervariasi tergantung pada usia anak, kondisi geografis, waktu atau musim tertentu. Diare merupakan gejala klinis yang umum dari infeksi gastrointestinal yang dapat disebabkan oleh berbagai patogen, termasuk bakteri, virus dan parasit. Beberapa bakteri patogen yang sering dikaitkan dengan kasus diare antara lain *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Campylobacter sp*, *Salmonella* dan *Shigella* (Purnamasari, 2019).

Shigella sp merupakan patogen penyebab diare dengan frekuensi tertinggi kedua setelah *Vibrio cholera* (37,1%), sementara diare akibat *Shigella* diperkirakan sekitar 27,3% kasus. *Shigella* memiliki sifat yang khas yaitu kemampuannya bertahan hidup di lingkungan asam termasuk dalam lambung. Selain itu, *Shigella* dikenal sangat infeksiif karena mampu menimbulkan penyakit hanya dengan jumlah inokulum yang sangat rendah, bahkan hanya 10-100 sel bakteri yang masuk ke dalam tubuh manusia, infeksi sudah dapat terjadi. Hal ini dapat menjadikan *Shigella* sangat mudah menular dari satu individu ke individu lainnya. Infeksi umumnya diawali dengan masuknya bakteri *Shigella* melalui kontaminasi *fecal-Oral* yaitu saat seseorang tanpa disadari mengkonsumsi makanan atau minuman yang sudah terkontaminasi kotoran yang mengandung bakteri *Shigella*. Dengan jumlah yang sangat kecil, bakteri ini sudah cukup untuk menyebabkan infeksi saluran cerna pada manusia. Secara genetik, strain *Shigella* merupakan diferensiasi

dari bakteri *Escherchia coli*. Oleh karena itu, antara seluruh strain *Shigella* dan *E. coli* memiliki keterkaitan DNA yang sangat erat (Rusdianto et al., 2020).

Gen *IcsA* merupakan salah satu gen yang berperan dalam proses virulensi pada bakteri *Shigella* sp yang dapat menyebabkan diare pada manusia. Langkah awal infeksi adalah keterikatan. *IcsA* melakukan pelekatan yang membantu bakteri menyebar melalui polimersisasi aktin didalam sel inang. Kemampuan untuk melakukan pelekatan ini memungkinkan mereka mampu melindungi diri dari kontak dengan lingkungan ekstraseluler dan tidak pernah menembus mukosa menjadi suatu infeksi sistemik. Gen *IcsA* memerlukan sepuluh asam amino untuk memastikan adhesi pada sel inang (Nasser et al., 2022).

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh (Alipour et al, 2012), dilakukan pengujian terhadap kemampuan set primer spesifik dalam mengkonfirmasi keberadaan gen *IcsA* dengan menggunakan beberapa jenis bakteri, hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa gen *IcsA* hanya ditemukan pada spesies bakteri *Shigella* sp. Pada penelitian (Rusdianto et al., 2020), dari 50 sampel klinis yang diuji, didapatkan 6 sampel terdeteksi gen *IcsA*. Berdasarkan hasil tersebut, peneliti menyimpulkan bahwa gen *IcsA* efektif dan dapat digunakan sebagai primer dalam mendeteksi *Shigella* sp.

Pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi gen *IcsA* adalah dengan PCR. PCR merupakan Teknik sintesis DNA secara in vitro yang bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA. Prinsip dasar metode ini adalah ampilifikasi DNA menggunakan enzim DNA polymerase pada suhu tinggi

yang dilakukan secara berulang dalam beberapa siklus. Pada proses PCR memerlukan oligonukleotida pendek (primer DNA) yang berfungsi untuk memulai sintesis DNA. Primer akan menempel (berikatan secara spesifik) pada salah satu untai DNA saat temperatur diturunkan setelah pemisahan untai ganda. Kelebihan dari metode PCR terletak pada kemampuannya memperbanyak DNA secara cepat, efisien yang dapat digunakan dalam waktu yang singkat (Dr. Syahran Wael & Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, 2023).

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian yang berjudul Deteksi Gen *IcsA* Pada Balita Penderita Diare Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan masalah apakah ditemukan gen *IcsA* pada feses balita penderita diare menggunakan metode PCR?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *IcsA* pada feses balita penderita diare dengan menggunakan metode PCR.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan aspirasi pemikiran atau edukasi dalam perkembangan ilmu kesehatan khususnya dibidang ilmu

mikrobiologi dan menambah wawasan bagi pembaca serta dapat digunakan sebagai referensi bagi penelitian - penelitian selanjutnya.

2. Manfaat Bagi Masyarakat

Diharapkan dengan adanya penelitian ini, masyarakat dapat mengetahui tentang gen *IcsA* yang berperan dalam virulensi pada bakteri *Shigella* sp dan penyakit yang disebabkan yaitu diare.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Diare

1. Definisi Diare

Diare (*diarrhead disease*) berasal dari kata *diarroia* dalam bahasa Yunani yang berarti mengalir terus. Diare merupakan keadaan buang air besar terus - menerus dalam keadaan abnormal dengan tinja lebih cair dari biasanya dan terjadi dalam jumlah tiga kali atau lebih dalam periode 24 jam. Umumnya, terjadi akibat adanya infeksi mikroorganisme seperti bakteri, virus, maupun parasit yang menyerang dan mengganggu fungsi saluran pencernaan (Iqbal et al., 2022).

Diare merupakan suatu gangguan pada sistem pencernaan yang menggambarkan keadaan buang air besar dalam kondisi yang tidak normal. Ciri utama dari diare adalah perubahan tekstur feses yang menjadi lunak hingga sangat cair, bahkan dalam beberapa kasus hanya berupa cairan saja. Selain itu, diare juga ditandai dengan peningkatan frekuensi buang air besar, biasanya sebanyak tiga kali atau lebih dalam kurun waktu 24 jam (Siahaan, 2024).

Di Indonesia diare masih menjadi salah satu permasalahan kesehatan masyarakat yang utama, mengingat jumlah kasus dan angka kematiannya masih tergolong tinggi. Kondisi ini sering kali dipicu oleh lingkungan yang tidak bersih dan perilaku tidak higienis. Salah satu gejala khas yang menjadi tanda dari diare adalah buang air besar dengan konsistensi tinja

encer atau bahkan dalam beberapa kasus hanya berupa cairan atau air saja (mencret) yang terjadi lebih dari tiga kali dalam sehari (Qisti et al., 2021)

Secara umum, diare didefinisikan sebagai suatu keadaan seseorang mengalami peningkatan frekuensi buang air besar disertai dengan perubahan konsistensi feses menjadi lebih cair atau encer dari biasanya. Hal yang perlu diwaspadai walaupun sebagian besar kasus diare berlangsung singkat dan dapat sembuh dalam beberapa hari, tidak jarang kondisi ini bertahan lebih lama, Bahkan dalam beberapa kasus kondisi ini dapat berlangsung dalam jangka waktu lebih lama, hingga terjadi selama berminggu-minggu. (Qisti et al., 2021).

2. Epideomologi

Hingga saat ini, diare masih menjadi salah satu masalah kesehatan yang serius di seluruh dunia, dengan angka kejadian yang tinggi dan berdampak terhadap angka kematian, terutama terhadap kelompok usia rentan. Diperkirakan setiap tahunnya diare menyebabkan sekitar 3,3 juta kematian di seluruh dunia. Angka kematian tertinggi akibat diare ditemukan ada kelompok anak-anak berusia di bawah 1 tahun, dengan angka kematian sekitar 20 anak per 1.000 kelahiran hidup. Sementara itu, pada kelompok anak berusia 1-5 tahun, angka kematian akibat diare cenderung lebih rendah, yaitu sekitar 5 per 1.000 anak. Di negara-negara berkembang, insiden diare bervariasi tergantung pada usia penderita, dengan kecenderungan angka kejadian yang lebih tinggi pada 2 tahun pertama kehidupan anak. Namun, seiring bertambahnya usia, angka

kejadian diare akan menurun. Tapi umumnya puncak kejadian diare biasanya terjadi pada usia 6-7 bulan, yaitu pada masa ketika bayi mulai beralih dari pemberian ASI eksklusif menuju pemberian makanan pendamping ASI. Masa transisi ini sering dikaitkan dengan meningkatnya resiko kontaminasi makanan maupun air minum yang memicu terjadinya diare. Selain menjadi salah satu penyebab utama morbiditas, diare juga tetap menjadi salah satu penyebab kematian yang paling penting, khususnya di negara-negara berkembang yang masih menghadapi tantangan besar dalam hal sanitasi dan penyediaan air bersih (Setyawan & Setyaningsih, 2021).

3. Etiologi

Penyebab diare dibagi menjadi beberapa faktor:

a. Faktor Infeksi

1) Faktor Enteral merupakan salah satu penyebab utama terjadinya diare pada anak, yang ditandai dengan adanya infeksi yang menyerang saluran pencernaan. Infeksi enteral ini mencakup berbagai agen penyebab, baik yang berasal dari kelompok bakteri virus, maupun parasit.

a) Infeksi bakteri, berbagai jenis bakteri yang diketahui dapat menjadi penyebab diare antara lain: *Aeromonas sp*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, dan *Vibrio cholerae*.

- b) Infeksi Virus, beberapa jenis virus yang sering menjadi penyebab diare antara lain: *Coronavirus*, *Astrovirus*, *Adenovirus enterik* dan *Rotavirus*. Di antara virus-virus tersebut, *Rotavirus* dikenal sebagai agen penyebab utama diare berat pada anak-anak, terutama di negara berkembang.
- c) Infeksi Parasit, parasit penyebab diare terdiri dari berbagai kelompok, diantaranya:
- (1) Cacing perut: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, dan *Strongyloides stercoralis*.
 - (2) Jamur: *Candida albicans*.
 - (3) Protozoa: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* dan *Balantidium coli*.
- 2) Infeksi Parenteral merupakan jenis infeksi yang tidak menyerang atau tidak berasal dari saluran pencernaan, melainkan menyerang organ atau bagian tubuh diluar sistem pencernaan. Infeksi ini dapat mengenai organ tubuh seperti telinga tengah yang dapat menyebabkan Otitis Media Akut (OMA), tenggorokan yang menimbulkan tonsilofaringitis, paru-paru yang berkembang menjadi bronkopneumonia, sistem saraf pusat yang memicu terjadinya ensefalitis dan sebagainya. kondisi ini umumnya ditemukan pada kelompok usia bayi dan anak-anak, terutama berusia di bawah 2 tahun.

b. Faktor Malabsorpsi

- 1) Malabsorpsi karbohidrat: suatu kondisi ketika tubuh tidak dapat menyerap berbagai jenis gula tertentu secara optimal di dalam saluran pencernaan. Gula-gula ini dapat berupa: Disakarida (Intoleransi laktosa, maltosa, sukrosa), Monosakarida (Intoleransi glukosa, fruktosa dan galaktosa). Diantara berbagai jenis malabsorpsi karbohidrat, intoleransi terhadap laktosa adalah yang paling sering jumpai dan penting diperhatikan, terutama pada bayi dan anak, karena dapat mempengaruhi asupan gizi mereka akibat gangguan dalam mengkonsumsi susu dan produk olahannya.
- 2) Malabsorpsi lemak: ketidakmampuan tubuh dalam menyerap lemak dari makanan yang di konsumsi. Gangguan ini bisa disebabkan oleh kurangnya enzim lipase atau gangguan pada produksi dan pengeluaran empedu yang berfungsi memecah lemak agar dapat diserap oleh usus. Akibatnya, lemak yang tidak tercerna dengan baik akan terbuang bersama tinja dalam jumlah berlebih, sehingga tinja tampak berminyak, berbau menyengat, dan kadang mengapung di air. Kondisi ini juga menyebabkan tubuh kekurangan energi serta vitamin-vitamin yang terlarut dalam lemak, seperti vitamin A, D, E, dan K, yang penting untuk berbagai fungsi tubuh.
- 3) Malabsorpsi protein: Gangguan pada proses penyerapan protein, dimana protein yang telah dipecah menjadi asam amino atau peptida oleh enzim pencernaan tidak dapat diserap dengan baik

oleh usus. Hal ini disebabkan oleh kerusakan mukosa usus atau kekurangan enzim tertentu, menyebabkan tubuh tidak dapat memperoleh asupan protein dalam jumlah yang cukup untuk pertumbuhan, perbaikan jaringan, serta fungsi tubuh lainnya. Pada anak-anak, gangguan ini dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan, serta menimbulkan gejala edema akibat rendahnya kadar protein dalam darah.

- c. Faktor pemberian antibiotik yang diberikan dengan dosis yang tidak tepat atau dengan durasi pengobatan yang tidak sesuai dengan standar terapi. Pemberian antibiotik secara tidak adekuat ini, baik karena dosis yang terlalu rendah, terlalu tinggi, atau durasi yang singkat ataupun terlalu lama, dapat mengganggu keseimbangan flora normal usus. Kondisi ini memberi peluang bagi pertumbuhan bakteri patogen tertentu, salah satunya bakteri *Clostridium difficile*. Infeksi bakteri ini sering kali menjadi penyebab diare yang dikenal dengan istilah *Clostridium Difficile Associated Diarrhea (CDAD)*.
- d. Faktor makanan, yaitu faktor penyebab diare yang disebabkan oleh mengkonsumsi makanan yang sudah tidak layak dimakan, seperti makanan yang basi atau terkontaminasi kuman dan zat beracun. Selain itu, diare juga dapat timbul akibat adanya reaksi hipersensitivitas atau alergi terhadap bahan makanan tertentu.
- e. Faktor psikologis, yaitu faktor yang berhubungan dengan kondisi emosional atau psikologis seseorang. Keadaan seperti rasa takut yang

berlebihan, stres, atau kesemasan. Meskipun jarang, dapat menyebabkan gangguan fungsi saluran pencernaan. Faktor ini lebih sering ditemukan pada anak-anak usia yang lebih besar, dimana respons saluran pencernaan terhadap tekanan psikologis lebih mungkin terjadi (Anggraini & Kumala, 2022)..

4. Patogenesis

Patogenesis terjadinya diare disebabkan oleh:

a. Bakteri.

Patogenesis diare akut akibat infeksi bakteri secara umum dibedakan menjadi 2 yaitu bakteri non invasif dan bakteri invasif, masing-masing dengan cara kerja dan dampak yang berbeda terhadap saluran pencernaan. Pertama, bakteri non invasif adalah jenis bakteri yang menyebabkan diare dengan cara memproduksi racun atau toksin, namun tidak masuk ke dalam jaringan usus secara langsung. Bakteri ini hanya menempel atau berikatan pada permukaan mukosa usus halus tanpa menyebabkan kerusakan struktur mukosa tersebut. Kedua, bakteri invasif adalah bakteri yang mampu menembus dan merusak dinding usus, terutama mukosa. Bakteri jenis ini bersifat enteroinvasif, artinya mereka menyerang sel-sel epitel usus dan menyebabkan kerusakan yang nyata. Kerusakan ini dapat berupa nekrosis (kematian jaringan) dan ulserasi (terbentuknya luka atau tukak pada mukosa usus). Secara klinis, diare yang disebabkan oleh bakteri invasif umumnya ditandai dengan tinja yang mengandung lendir, dan darah,

dan disertai keluhan seperti demam, nyeri perut, dan tenesmus. Salah satu ciri khas pada beberapa kasus adalah tinja yang tampak seperti air cucian beras yang mencerminkan tingginya kandungan lendir dalam tinja akibat peradangan mukosa usus.

b. Virus

Proses infeksi umumnya diawali ketika virus masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan akibat konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi. Setelah mencapai usus halus, virus akan menginfeksi dan merusak sel-sel epitel pada mukosa usus. Sel-sel yang mengalami kerusakan tersebut kemudian digantikan oleh enterosit baru yang masih imatur atau belum matang, sehingga belum dapat menjalankan fungsinya dengan baik. Akibatnya villi mengalami atrofi atau penyusutan yang semakin mengganggu kemampuan usus dalam menyerap cairan dan makanan yang tidak terserap justru terdorong keluar bersama tinja, sehingga menimbulkan gejala diare. Secara klinis, infeksi virus yang menyerang saluran cerna ini umumnya menimbulkan beberapa manifestasi khas, seperti diare akut yang ditandai dengan frekuensi buang air besar yang meningkat, demam ringan hingga tinggi, nyeri atau kram pada perut, serta gejala dehidrasi akibat kehilangan cairan tubuh dalam jumlah besar yang signifikan. Gejala-gejala tersebut biasanya timbul secara tiba-tiba dan berlangsung selama beberapa hari tergantung pada jenis virus

penyebab dan respon sistem imun individu yang terinfeksi. (Setyawan & Setyaningsih, 2021).

5. Klasifikasi Diare

a. Diare Akut

Diare akut umumnya juga dikenal dengan istilah gastroenteritis, yaitu suatu kondisi peradangan pada saluran cerna, yang ditandai dengan munculnya gejala diare secara mendadak. Kondisi ini biasanya berlangsung dalam jangka waktu yang cukup singkat, yaitu kurang dari 14 hari. Selain gejala utama berupa diare, gastroenteritis akut sering kali disertai dengan keluhan seperti mual, muntah, demam, dan nyeri area perut (abdomen). Sekitar 80% dari seluruh kasus, disebabkan oleh infeksi virus sedangkan infeksi akibat bakteri biasanya memiliki gejala diare berdarah.

b. Diare Kronik

Diare yang terjadi dalam jangka waktu yang cukup lama umumnya ditandai dengan keluarnya tinja yang mengandung cairan dan elektrolit secara berlebihan. Kondisi ini disertai dengan peningkatan frekuensi buang air besar secara signifikan dibanding dengan frekuensi normal individu sehat, konsistensi tinja yang semakin encer atau lembek. Selain itu, volume tinja yang dikeluarkan semakin bertambah secara bertahap. Apabila gejala-gejala tersebut berlangsung secara terus-menerus selama lebih dari 14 hari, maka kondisi ini dikategorikan sebagai diare kronis.

c. Diare Persisten

Diare persisten merupakan kondisi gangguan saluran pencernaan yang awalnya dimulai sebagai diare akut, namun berlangsung lebih lama dari durasi bias, yaitu lebih dari 14 hari. Pada awalnya diare ini dapat muncul dalam bentuk diare cair akut atau yang lebih parah seperti disentri. Meskipun awalnya tampak seperti diare biasa, ketika gejalanya tidak mereda dalam waktu dua minggu, maka diare tersebut diklasifikasikan sebagai persisten karena telah berlangsung cukup lama dan beresiko menimbulkan komplikasi serius. Kondisi ini sering kali terjadi akibat adanya infeksi bakteri atau parasit tertentu yang berhasil masuk dan bertahan dalam tubuh, khususnya pada anak-anak yang memiliki sistem kekebalan tubuh yang belum matang sepenuhnya. (Anggraini & Kumala, 2022).

6. Cara Penularan

Sebagian besar kasus penularan diare yaitu sekitar 75% disebabkan oleh infeksi virus dan bakteri yang ditularkan melalui fekal - oral dengan mekanisme penularan dimana mikroorganisme patogen dari tinja penderita menyebar dan masuk ke dalam tubuh orang lain. Jalur ini umumnya terjadi melalui air yang terkontaminasi baik air minum maupun air yang digunakan untuk memasak dan mencuci makanan. Kontaminasi air bisa terjadi pada berbagai tahap, seperti saat air masih berada di sumbernya, tercemar saat dalam perjalanan kerumah, atau tercemar pada saat penyimpanan dirumah. Selain itu, tinja yang sudah terinfeksi virus atau

bakteri yang apabila dihirup atau hewan lalu hewan tersebut hinggap dimakan atau minuman, yang jika makanan atau minuman tersebut dikonsumsi maka akan masuk ke dalam tubuh yang menyebabkan bakteri atau virus akan mulai berkembang biak disaluran pencernaan dan dapat menyebabkan diare (Setyawan & Setyaningsih, 2021).

Air minum yang tercemar merupakan salah satu faktor utama penyebab meningkatnya angka kejadian diare yang terjadi di negara-negara berkembang. Kondisi ini diperparah oleh kebiasaan masyarakat yang kurang memperhatikan kebersihan lingkungan, seperti membuang sampah di sembarang tempat, serta menggunakan air yang tidak bersih sebagai sumber air minum sehari-hari (Setyawan & Setyaningsih, 2021).

7. Faktor Resiko

Faktor resiko yang dapat menyebabkan diare diantaranya yaitu:

a. Faktor Lingkungan

Faktor lingkungan memegang peranan yang sangat besar dalam terjadinya diare, diperkirakan bahwa setidaknya 94% kejadian diare disebabkan oleh kondisi lingkungan yang tidak sehat. Lingkungan yang tidak sehat mencakup berbagai sumber pencemaran yang dapat menjadi tempat berkembang biaknya mikroorganisme patogen seperti saluran pembuangan limbah yang tidak terkelola dengan baik, tempat sampah, limbah dari aktivitas industri yang mencemari tanah dan perairan sekitar. Kondisi ini semakin diperburuk dengan adanya faktor resiko tambahan sumber air minum yang tidak sehat, serta

minimnya penerapan perilaku hidup bersih dan sehat (PHBS) dalam kehidupan sehari-hari (Khairunnisa et al., 2020).

b. Tingkat Pendidikan

Tingkat pendidikan memegang peranan cukup penting yang mempengaruhi derajat kesehatan masyarakat, terutama dalam hal pemahaman, kesadaran, dan perilaku terhadap pencegahan penyakit. Rendahnya tingkat pendidikan masyarakat menyebabkan kesulitan dalam menerima informasi kesehatan mengenai pentingnya menjaga kebersihan diri dan kebersihan lingkungan sebagai upaya mencegah terjangkitnya penyakit menular, diantaranya diare. Karena keterbatasan dalam hal pengetahuan, individu dengan latar belakang Pendidikan yang rendah cenderung kurang responsif terhadap edukasi dan penyuluhan kesehatan yang diberikan oleh tenaga kesehatan atau pihak terkait. Hal ini menyebabkan minimnya kepedulian terhadap upaya pencegahan penyakit. (Setyawan & Setyaningsih, 2021).

c. Faktor Perilaku Kesehatan

Perilaku kesehatan yang kurang baik seperti kebiasaan jarang mencuci tangan sebelum makan dan setelah buang air besar, serta membuang tinja dengan cara yang salah, dapat meningkatkan resiko penularan berbagai penyakit, salah satunya diare. Selain itu, tidak memberikan ASI eksklusif secara optimal selama 4 sampai 6 bulan dapat meningkatkan resiko bayi menderita diare. Bayi yang tidak menerima ASI secara penuh lebih rentan terserang diare dibandingkan

dengan bayi yang mendapatkan ASI eksklusif. Hal ini dikarenakan ASI mengandung berbagai zat kekebalan tubuh alami yang sangat penting bagi sistem imun bayi yang masih berkembang. Pemberian ASI pada bayi yang baru lahir akan memberikan daya lindung 4 kali lebih besar terhadap diare dari pada pemberian ASI yang disertai dengan susu formula (Prawati & Haqi, 2019).

B. Tinjauan Umum *Shigella*

Tingginya angka kejadian diare dapat disebabkan oleh berbagai faktor. Salah satu penyebab utamanya adalah adanya infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti virus, bakteri, maupun parasit. Infeksi ini dapat terjadi ketika sistem kekebalan tubuh seseorang tidak mampu melawan masuknya agen penyebab penyakit ke dalam tubuh, terutama melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi. Selain infeksi, faktor lain yang ikut berperan yaitu gangguan penyerapan zat gizi atau dikenal dengan malabsorpsi makanan. Kondisi ini menghambat tubuh dalam menyerap nutrisi penting dari makanan, sehingga memperlemah imunitas tubuh dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit, termasuk diare. Status gizi balita, perilaku *hygiene*, dan kebersihan lingkungan sekitar juga menjadi pemicu utama meningkatnya kasus diare. Bakteri yang paling sering di temukan sebagai penyebab diare adalah *Escherichia coli* dan *Shigella* sp (Siregar et al., 2019).

Shigella sp merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat menginfeksi hewan maupun manusia. Secara morfologi, *Shigella* sp adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, berukuran sekitar 0,5x1-3µm, tidak

berspora, tidak memiliki kapsul, dan non motil, pertumbuhan optimumnya pada suhu 37°C dengan pH 7,4 (Sari et al., 2018).

Selain itu, *Shigella* dikenal sebagai bakteri gram negatif berbentuk basil (batang tunggal) yang tidak memiliki flagel, bersifat aerobik maupun anaerobik fakultatif serta tidak membentuk spora. Habitat utamanya adalah pada saluran pencernaan, dan proses infeksi biasanya melalui jalur oral. *Shigella* memiliki kemampuan mengeluarkan LT toksik (*Heat-Labile toxin*) yang akan menginvasi ke epitel sel mukosa usus halus dan berkembang dengan baik pada daerah invasi tersebut (Aini, 2018).



Gambar 1. Struktur morfologi bakteri *Shigella* sp yang diamati dengan SEM (Setiarto, 2020).

Shigella akan mengeluarkan toksin yang akan memicu terjadinya perubahan sistematik pada mukosa usus yang dapat menyebabkan sel-sel akan mati pada jaringan epitel usus halus, sehingga terjadi luka-luka kecil pada area invasi. kondisi ini memicu respon inflamasi dan meningkatkan permeabilitas usus, sehingga menyebabkan keluarnya feses yang tidak hanya bersifat cair, tetapi juga sering kali bercampur dengan lendir dan darah. Karena dihasilkan oleh bakteri *Shigella* diekskresikan bersama feses penderita, maka spesimen

tinja merupakan bahan utama yang digunakan dalam proses isolasi dan identifikasi laboratorium untuk mendeteksi keberadaan bakteri (Aini, 2018).

Berdasarkan urutan tingkat taksonominya, maka bakteri *Shigella* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
Filum : *Proteobacteria*
Kelas : *Gamma Proteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Family : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Shigella*
Spesies : *Shigella* sp (Chrismasyanti et al., 2020).

Shigella terdiri atas 4 spesies yang dibedakan berdasarkan serologis:

- *Shigella dysenteriae* (serogrup A), ada 12 serotipe
- *Shigella flexneri* (serogrup B), ada 6 serotipe
- *Shigella boydii* (serotype C), ada 18 serotipe
- *Shigella sonnei* (serogrup D), ada 1 serotipe

Shigella merupakan jenis bakteri patogen yang dikenal sebagai penyebab utama infeksi usus yang di sebut *shigellosis*. Infeksi yang ditimbulkan bakteri ini tergolong sangat menular karena memiliki dosis infeksi yang sangat rendah, yaitu cukup 10-200 sel bakteri saja untuk menyebabkan nyekakit pada terpapar. Mekanisme penularannya terjadi melalui jalur fekal-oral, biasanya akibat konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh feses penderita yang mengandung bakteri tersebut dan menyerang usus. Setelah

berhasil masuk ke dalam tubuh, *Shigella* tidak hanya melakukan invasi sel epitel usus, tetapi juga memproduksi dua jenis toksin utama, yaitu yaitu endotoksin dan eksotoksin. Adanya kerja toksin inilah yang sebenarnya berperan dalam terjadinya infeksi di saluran pencernaan. Kedua toksin ini memiliki mekanisme kerja dan ampak fisiologis yang berbeda. Endotoksin yang dihasilkan oleh dihasilkan oleh bakteri *Shigella* merupakan bagian dari struktur dinding sel bakteri gram negatif, yaitu Liposakarida (LPS) yang dilepaskan saat bakteri mengalami lisis. Endotoksin ini berperan dalam menyebabkan iritasi pada dinding usus. Sementara itu eksotoksin, menghasilkan neurotoksin, enterotoksin dan sitotoksin. Masing-masing toksin ini mempunyai peranan yang berbeda. Neurotoksin berperan dalam menyerang sistem saraf, yang dapat menyebabkan gejala seperti demam dan nyeri dan kram perut. Enterotoksin berperan dalam merusak kerja usus dengan meningkatkan gerakan peristaltik usus sehingga dapat menyebabkan tenesmus, yaitu rasa ingin buang air besar yang terus-menerus dan tidak tuntas. Sedangkan sitotoksin berperan dalam menyebabkan penekanan fungsi sel yang menyebabkan kerusakan atau kematian sel di area yang terinfeksi (Alifya et al., 2022).

Shigella memiliki kemampuan menyerang atau menginvasi permukaan sel epitel kolon (usus besar). Meskipun demikian, invasi ini umumnya terbatas pada permukaan mukosa jarang menembus sampai melewati mukosa dan lapisan lebih dalam. Oleh karena itu, meskipun penderita menunjukkan gejala seperti demam tinggi (hiperpireksia) dan toksemia, bakteri ini biasanya tidak

terdeteksi dalam sirkulasi darah, sehingga tidak ditemukan hasil biakan darah. Setelah menginvasi enterosit kolon, bakteri *Shigella* menyebabkan terjadi perubahan permukaan mikrovili dari *brush border* yang menyebabkan pembentukan vesikel pada membran mukosa. Bakteri ini kemudian dapat menghancurkan vakuola fagositik intraselular dan masuk ke dalam sitoplasma untuk memperbanyak diri dan menginvasi sel yang berdekatan. Kemampuan *Shigella* menginvasi sel epitel ini berhubungan erat dengan adanya plasmid besar (120-140 MD) yang memiliki kemampuan mengenali bagian luar membran protein seperti *plasmid antigen invasions* (Ipa). Sel epitel akan mati dan terjadi ulserasi dan inflamasi pada mukosa. Dari bagian yang mengalami inflamasi tersebut, *Shigella* menghasilkan eksotoksin yang terdiri dari tiga jenis berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu neurotoksin, enterotoksin, dan sitotoksin. Akibat dari aktivitas toksin-toksin ini, penderita akan mengalami berbagai gejala khas *Shigellosis*, seperti demam, rasa tidak enak badan (malaise), serta nyeri otot.

C. Tinjauan Umum Gen *IcsA*

Sifat virulensi dasar yang dimiliki oleh seluruh bakteri *Shigella* sp adalah kemampuannya untuk menginvasi sel-sel epitel usus besar (kolon). Kemampuan ini dikendalikan oleh keberadaan plasmid berukuran besar, yakni sekitar 120 – 140 MD yang membawa sejumlah gen yang mengatur proses sintesis polipeptida yang berperan dalam invasi dan kerusakan sel inang. Plasmid ini terdiri dari *Invasion Plasmid Antigen* (IPA), yaitu gen yang mengkode 4 jenis polipeptida utama yang sangat imunogenik yaitu IpaA,

IpaB, IpaC, dan IpaD. Keempat lipoprotein ini dilepaskan melalui sistem sekresi tipe III untuk membantu bakteri masuk ke dalam sel epitel dengan reorganisasi sitoskeleton sel inang dan membentuk pori pada membran plasma sel target (Rusdianto et al., 2020).

Proses invasi yang dilakukan oleh *Shigella* tidak hanya bergantung pada plasmid virulensi, tetapi juga dipengaruhi oleh peran gen-gen tertentu, baik yang terdapat pada plasmid maupun kromosom. Gen *virF* yang terletak pada plasmid virulensi, mengkodekan protein berukuran sekitar 30 kDa yang positif mengatur aktivasi transkripsi gen-gen *IPA* serta gen virulensi penting lainnya seperti *IcsA*. Selain itu, terdapat gen *virR* yang terletak pada kromosom, membantu mendukung stabilitas sistem virulensi bakteri. Oleh karena itu, meskipun banyak faktor virulensi dikodekan oleh plasmid, keberadaan elemen genetik di kromosom diperlukan agar *Shigella* dapat mengekspresikan virulensinya secara maksimal. Salah satu contoh peran kromosom adalah dalam sintesis lipopolisakarida (LPS), yang penting dalam menjaga integritas dinding sel dan menghindari deteksi sistem imun (Rusdianto et al., 2020).

Semua spesies dari *Shigella* memiliki plasmid virulensi yang mengkodekan gen yang berperan dalam proses invasi dan penyebaran bakteri. Beberapa gen tersebut antara lain gen *IcsA*, *IpaJ* dan *IpgD* merupakan gen yang berperan dalam virulensi. Gen *IcsA* (*Intracellular Spread Gene A*) merupakan salah satu gen kunci dalam sistem virulensi bakteri *Shigella* karena berperan dalam penyebaran bakteri baik di dalam sel (intraseluler) maupun antar sel (interseluler). Gen ini mengkode protein permukaan luar membran

sel, yang berfungsi unik dalam memanipulasi sistem aktin intraseluler sel inang. Dengan bantuan protein *IcsA*, *Shigella* dapat membentuk struktur *actin tail* (ekor aktin), yaitu filamen aktin yang memungkinkan bakteri dapat bergerak secara aktif di dalam sitoplasma sel inang, serta menyebar dari satu sel ke sel sekitarnya tanpa harus melewati ruang ekstraseluler. Mekanisme ini memberikan keuntungan besar bagi *Shigella*, karena memungkinkan bakteri untuk menghindari deteksi oleh sistem imun (Rusdianto et al., 2020).

Secara struktural, gen *IcsA* terdiri atas tiga domain yang masing-masing memiliki peran penting. Bagian pertama adalah N-terminal yang tersusun atas 52 asam amino dan berfungsi sebagai sinyal awal translasi. Bagian kedua adalah α -domain, yang terdiri atas 706 asam amino dan berperan dalam adhesi serta inisiasi polimerisasi aktin. Sementara itu, bagian ketiga yaitu C-terminal β -core, tersusun dari 344 asam amino dan berfungsi dalam stabilisasi serta orientasi protein *IcsA* pada permukaan bakteri (Rusdianto et al., 2020).

Virulensi dari *Shigella* berhubungan dengan 3 hal, yaitu (1) Plasmid, yang memungkinkan bakteri mengenali dan melekat pada sel epitel. Tanpa plasmid ini, *Shigella* kehilangan sifat virulennya dan tidak mampu menyebabkan infeksi secara efektif. Pada tahap awal infeksi, gen *IcsA* melakukan pelekatan yang membantu bakteri menyebar melalui polimerisasi aktin di dalam sel. Sepuluh asam amino dibutuhkan gen *IcsA* untuk memastikan terjadinya adhesi pada sel inang (Nasser et al., 2022). (2) aktin intraseluler, yang berfungsi sebagai media transportasi bagi bakteri untuk berpindah dan berkembang secara aktif di dalam sel. Gangguan atau mutasi

pada sistem interaksi IcsA-aktin akan berdampak pada menurunnya kemampuan mobilitas bakteri, sehingga virulensinya pun berkurang. (3). Kemampuan untuk menetap pada lapisan epitel, yang memberi keuntungan bagi *Shigella* dalam melindungi diri dari lingkungan ekstraseluler tidak pernah menembus mukosa. Oleh karena itu, infeksi oleh *Shigella* umumnya bersifat lokal di mukosa usus dan jarang menyebabkan infeksi sistemik (Rusdianto et al., 2020).

D. Tinjauan Umum *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) atau dikenal sebagai reaksi berantai polimerase adalah suatu metode sintesis enzimatik yang digunakan untuk memperbanyak atau mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* tanpa menggunakan organisme. Teknik ini memungkinkan produk Salinan DNA dalam jumlah yang besar. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983 dan menjadi salah satu tonggak penting dalam bioteknologi molekuler (Effendi, 2018).

Secara umum, PCR merupakan suatu metode amplifikasi DNA secara *in vitro* yang bertujuan menghasilkan fragmen DNA spesifik dalam jumlah besar dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan sebelumnya dari sebagian kecil templete kompleks. Prinsip utama teknik ini didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua primer oligonukleotida, yaitu molekul pendek DNA untai tunggal yang bersifat komplementer dengan ujung 5' dari masing-masing DNA target. Oligonukleotida tersebut digunakan sebagai primer yang sangat penting dalam

proses replikasi DNA. Dengan primer ini, DNA Polymerase dapat mengenali dan mengikat DNA template, sehingga memungkinkan enzim tersebut untuk menyalin urutan yang ada (Salsabila et al., 2021).

Keberhasilan proses PCR sangat bergantung oleh beberapa faktor penting, salah satunya ditentukan oleh primer yang digunakan dalam reaksi tersebut. Primer merupakan molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri dari sekitar 30 basa dan memiliki peran penting dalam proses PCR. Primer memiliki peranan penting karena ia menentukan lokasi spesifik pada DNA target yang akan diamplifikasi. karenanya diperlukan kriteria tertentu yang harus dipenuhi untuk memperoleh desain primer terbaik. Kesalahan dalam primer, seperti ketidaksesuaian sekuens atau suhu annealing yang tidak optimal, dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak spesifik atau bahkan kegagalan dalam pembentukan produk PCR. (Salsabila et al., 2021).

Proses PCR membutuhkan beberapa komponen utama untuk berlangsung secara optimal. Komponen tersebut meliputi: (1). DNA template, yaitu fragmen atau potongan DNA yang mengandung sekuens target yang ingin diamplifikasi; (2). Sepasang primer (Forward) dan (Reverse), yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; (3). dNTPs (*Deoxynucleotide triphosphates*), yaitu campuran dari empat jenis nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) yang akan digunakan sebagai bahan baku sintesis untai DNA baru; (4). Buffer PCR, yang menjaga kestabilan pH dan menyediakan lingkungan reaksi yang optimal untuk aktivitas enzim; (5).

Magnesium klorida ($MgCl_2$) yang berfungsi sebagai kofaktor penting bagi aktivitas DNA polymerase serta memengaruhi efisiensi dan spesifitas reaksi amplifikasi dan (6). Enzim DNA polimerase, terutama jenis termostabil seperti Taq polymerase, yang berperan dalam memperpanjang primer dengan menambahkan nukleotida secara berurutan sesuai dengan cetakan DNA target (Siallagan et al., 2022).

PCR dijalankan secara teknis dan berurutan. PCR dijalankan dengan prinsip dasar yang melibatkan proses sintesis fragmen DNA secara spesifik menggunakan dua primer oligonukleotida. Primer tersebut dirancang sedemikian rupa untuk menghibridisasi secara komplementer pada pita DNA target dari dua sisi berlawanan, sehingga mampu mengikat fragmen DNA yang ingin diamplifikasi. Teknik ini menggunakan enzim DNA polymerase yang mampu bekerja secara efisien pada suhu tinggi, terutama enzim Taq polymerase yang tahan panas. Dengan keberadaan primer dan enzim ini, DNA template dapat disalin melalui proses sintesis nukleotida yang berlangsung sesuai urutan target. Proses reaksi ini dilakukan dalam perangkat laboratorium khusus yang disebut *thermocycler*, yaitu alat otomatis yang memungkinkan pengaturan suhu dalam rentang tinggi dan rendah secara berulang-ulang sesuai dengan tahapan reaksi. Dalam satu siklus PCR terdapat tiga tahapan utama, yaitu: (1). Denaturasi, yaitu pemanasan sampel pada suhu tinggi untuk memisahkan rantai DNA untai ganda menjadi untai tunggal; (2). Annealing, yaitu penurunan suhu untuk memungkinkan primer menempel secara spesifik pada target DNA; (3). Extension (pemanjangan), dimana DNA polymerase

memperpanjang rantai DNA baru dengan menambahkan nukleotida sesuai cetakan DNA target. Seluruh bahan reaksi seperti deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), primer oligonukleotida, DNA template, buffer, enzim termostabil Taq polymerase dicampurkan dalam tabung reaksi sebelum dimasukkan ke dalam thermocycler. Selama berlangsungnya siklus, reaksi ini meniru proses perlikasi DNA yang terjadi di dalam sel (*in vivo*), tetapi dengan control yang lebih presisi dalam lingkungan buatan. Dengan pendekatan ini, teknik PCR menjadi metode yang sangat efisien dan sensitif untuk mendeteksi bahkan dalam sejumlah kecil DNA, yang menghasilkan produk amplifikasi dalam jumlah besar setelah puluhan siklus reaksi (Effendi, 2018).

Teknik PCR terdiri dari beberapa tahapan penting yang berlangsung secara berurutan untuk memastikan proses amplifikasi DNA berjalan dengan efektif. Tahapan-tahapan tersebut meliputi yaitu pra-denaturasi templat DNA, denaturasi templet DNA, penempelan primer (*annealing*), pemanjangan untai DNA (*extension*), dan pemantapan (*post extension*). Tahap denaturasi templat DNA, penempelan primer (*annealing*), pemanjangan untai DNA (*extension*) merupakan tahapan yang diulang-ulang sesuai jumlah siklus yang diprogram. Pada setiap siklus akan terjadi penggandaan jumlah DNA.

1. Pra-Denaturasi

Tahap awal pada teknik PCR umumnya dilakukan pada suhu tinggi 94-96°C selama rentang waktu 2-20 menit. Pada tahap ini terjadi persiapan pemisahan templet DNA untai ganda menjadi untai tunggal (*denaturasi*) dan mengaktifkan enzim polimerase. Pada umumnya pada suhu 94-95°C

dengan waktu 2-3 menit cukup untuk melakukan denaturasi pada seluruh DNA genom, namun untuk beberapa jenis enzim polymerase tertentu membutuhkan waktu lebih lama sekitar 15-20 menit pada suhu 95°C untuk diaktifkan. Di sisi lain, jenis enzim polimerase yang telah dimodifikasi seperti iTaqTM, proses aktivasi enzim dapat dicapai hanya dalam waktu 15-30 detik pada suhu 98°C.

2. Denaturasi

Pada tahap denaturasi, DNA untai ganda akan dipisahkan menjadi dua untai tunggal. Tahapan ini biasanya dilakukan selama sekitar 3 menit pada suhu 90-95°C untuk memastikan agar seluruh untai ganda DNA yang akan diamplifikasi telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. Jika proses denaturasi terlalu singkat, kemungkinan pemisahan untai tidak terjadi secara optimal, yang bisa menyebabkan kedua untai DNA kembali berikatan menjadi bentuk untai ganda. Kondisi ini mengakibatkan kegagalan proses amplifikasi dalam PCR. Sebaliknya, jika tahap denaturasi berlangsung terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim Taq polymerase.

3. Penempelan Primer (*Annealing*)

Pada tahap ini, primer akan berikatan pada daerah spesifik dari templat DNA yang komplementer dengan sekuen nukleotida primer. Suhu annealing ditentukan oleh panjang primer dan komposisi jenis basa nukleotida penyusun primer. Suhu annealing berada pada kisaran antara 36-72°C. Namun, suhu yang umum digunakan pada proses ini yakni 50-

60°C. Semakin panjang ukuran primer yang digunakan, maka suhu yang diperlukan untuk proses penempelan semakin tinggi. Lama waktu yang biasa digunakan untuk proses penempelan primer berkisar antara 30-45 detik.

Pada tahap *annealing*, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan nukleotida yang komplemen pada templet DNA. Adanya ikatan primer dan templat DNA, akan menyebabkan enzim DNA polimerase mengenali lokasi yang perlu diperkuat ikatan hidrogennya sehingga tidak terputus kembali ketika dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya

4. Pemanjangan Untai DNA (*Extension*)

Tahap pemanjangan umumnya optimum pada suhu 72°C. Suhu ini merupakan suhu optimum untuk aktivitas enzim Taq polimerase dalam melakukan polimerisasi DNA. Setelah primer menempel pada templat DNA, akan mengalami perpanjangan sekuen pada ujung 3' dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat DNA dengan bantuan enzim polimerase.

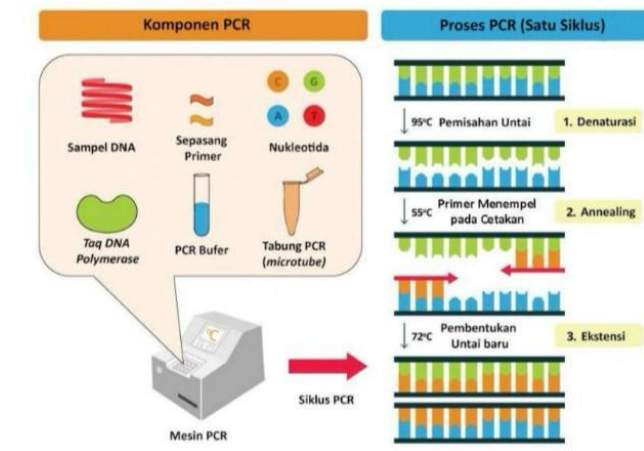
Kecepatan kerja enzim DNA polimerase dalam melakukan proses polimerisasi nukleotida adalah sekitar 35-100 nukleotida/detik, tergantung pada kondisi reaksi. Berapa faktor yang mempengaruhi kecepatan dan efisiensi kerja enzim ini antara lain pH dari campuran bahan PCR, jenis bufer, konsentrasi garam MgCl₂, serta molekul DNA target. Pada umumnya menit mampu menghasilkan produk PCR sepanjang 2000 pasang basa dalam kurun waktu 1 menit. Pada akhir siklus PCR, umumnya

untuk memastikan seluruh fragmen DNA target telah berhasil disintesis secara sempurna dan membentuk untai ganda yang lengkap, diberikan tambahan waktu selama sekitar 5 menit untuk memastikan bahwa terbentuknya DNA untai ganda pada seluruh produk PCR.

5. Pemantapan (*Post Extension*)

Setelah semua siklus utama dalam reaksi PCR selesai dilakukan, proses selanjutnya yang sangat penting adalah tahap pemantapan atau untuk memastikan penyempurnaan proses sintesis secara lengkap pada semua produk PCR. Proses pemantapan dilakukan dengan inkubasi akhir pasca PCR. Tahap ini dilakukan selama 5-10 menit pada suhu 72°C. Suhu tersebut dipertahankan karena suhu optimum bagi enzim taq polymerase untuk melanjutkan dan menyelesaikan proses sintesis DNA secara sempurna. Tujuan utama dari tahap ini adalah untuk memastikan bahwa semua untai DNA yang belum sepenuhnya diperpanjang selama siklus sebelumnya dapat terselesaikan pembentukannya sehingga seluruh produk PCR memiliki ukuran dan struktur yang lengkap dan akurat.

Tahap ini biasanya disebut sebagai bagian dari tahap perpanjangan untai DNA (*extension*). Tujuan utamanya adalah untuk memberikan kesempatan agar terjadi penempelan kembali (*reannealing*) produk PCR menjadi DNA untai ganda. Hasilnya, untai ganda divisualisasikan menggunakan Ethidium bromide setelah elektroforesis gel agarose. Untuk produk PCR berukuran 100-1.000 bp tahap post extension dapat dipersingkat menjadi 30-60 detik (Kusnadi et al., 2022).



Gambar 2. Proses dan komponen PCR (Kusnadi & Arumingtyas, 2020)

Setelah tahapan utama yang dilakukan dalam proses PCR seperti denaturasi, annealing dan ekstensi yang dilakukan secara berulang dalam setiap siklus, keberhasilan amplifikasi DNA sangat bergantung pada efisiensi dan spesifitas di setiap tahap, terutama pada proses penempelan primer (*annealing*). Dalam hal ini, terdapat tiga tahap paling essensia yang mendasari jalannya proses PCR, yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi. Salah satu tahap kritis adalah annealing, dimana primer liganukleotida akan menempel pada urutan spesifik DNA target yang telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. Penempelan ini hanya dapat terjadi secara optimal jika suhu *annealing* berada pada kisaran yang sesuai. Suhu terlalu tinggi dapat menyebabkan gagalnya primer menempel, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat meningkatkan resiko penempelan primer pada lokasi yang tidak spesifik, sehingga berpotensi menghasilkan produk PCR yang tidak diinginkan. (Amanda et al., 2015).

Primer akan menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu gen target yang berasal dari waktu pendinginan primer hingga suhu tertentu setelah proses pemisahan dengan denaturasi termal untai ganda DNA (unamplified DNA) templat. Tahapan berikutnya adalah ekstensi (*extension*), dimana primer yang telah berikatan akan di perpanjang oleh enzim polymerase. Proses ini memerlukan adanya bahan dasar sintesis DNA berupa dNTPs (deoksiribonukleotida trifosfat), yaitu molekul prekursor dari empat jenis basa nukleotida (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP). Selain itu, dibutuhkan pula buffer PCR yang berfungsi untuk mempertahankan kondisi pH optimal dan kestabilan enzim selama reaksi berlangsung. Reaksi PCR umumnya dijalankan dalam 20-40 siklus. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20-40 siklus. Pada siklus-siklus awal, khususnya Setelah siklus keempat, jumlah fragmen DNA target yang diinginkan (spesifik) (*short target product*) akan meningkat secara eksponensial karena setiap produk yang dihasilkan menjadi cetakan baru untuk siklus selanjutnya. Sementara itu, produk DNA non-target (non spesifik) (*long product*) yang tidak teramplifikasi secara optimal hanya akan mengalami peningkatan secara linier (Siallagan et al., 2022).

Seiring dengan kemajuan teknologi molekuler, metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mengalami perkembangan yang signifikan sejak pertama kali di perkenalkan. Pada awalnya teknik PCR dikembangkan dari mesin thermocycler sederhana, yaitu alat yang suhunya dapat diatur sedemikian rupa sehingga mampu mengakomodasi tiga tahapan utama dalam proses PCR seperti denaturasi yaitu pemisahan untai ganda DNA menjadi

untaian tunggal melalui pemanasan; annealing, yaitu penempelan primer pada daerah sekuens DNA target; dan ekstensi, yaitu pemanjangan rantai DNA oleh enzim DNA polymerase. Produk amplifikasi hasil PCR tersebut kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran molekulnya menggunakan gel elektroforesis, selanjutnya dilakukan proses pewarnaan DNA dan divisualisasi di bawah sinar ultraviolet (UV). Pola pita DNA yang muncul menunjukkan keberadaan produk PCR, sehingga hasilnya dapat dinilai secara visual. Pada teknik ini, hanya menampilkan keberadaan pita DNA tanpa memberikan informasi berapa jumlah copy DNA yang dihasilkan dari setiap siklus sehingga teknik ini dikenal dengan sebutan PCR kualitatif (Nugroho et al., 2021).

Adanya pita pada sampel yang berhasil diamplifikasi dapat diamati dari hasil visualisasi produk PCR dengan elektroforesis, tetapi tidak semua sampel tersebut menunjukkan pita DNA dengan ketebalan yang sama. Hal ini dikarenakan perbedaan DNA hasil ekstraksi di dalam templet yang digunakan untuk PCR dan juga perbedaan konsentrasi DNA yang sudah diperbanyak (Pertiwi et al., 2015).

Menurut (Effendi, 2018) Macam-macam metode PCR adalah sebagai berikut:

1. PCR Konvensional

Metode ini memungkinkan sejumlah kecil molekul DNA untuk diamplifikasi beberapa kali secara eksponensial dan telah banyak digunakan dalam penelitian di bidang medis dalam uji diagnostik untuk mengidentifikasi mikroorganisme patogen. Produk PCR yang diperoleh

dengan metode PCR konvensional dapat diidentifikasi ukurannya menggunakan gel elektroforesis yang dilanjutkan dengan pewarnaan. Selama proses elektroforesis, DNA yang diamplifikasi akan dipisahkan berdasarkan ukuran molekul DNA (untai DNA yang berukuran lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel dibandingkan yang berukuran lebih besar). Sesudah selesai dilakukan gel elektroforesis, gel dicuci dalam buffer yang mengandung zat warna yang secara spesifik mewarnai DNA, sehingga bila dilihat dengan sinar ultraviolet akan menunjukkan fluoresensi. Ukuran dari produk PCR dapat ditentukan dengan membandingkan terhadap DNA ladder yang mengandung fragmen DNA yang sudah diketahui ukurannya.

2. *Real-time* PCR

Real-time PCR yang juga dikenal dengan istilah quantitative PCR (qPCR) atau kinetik PCR. Metode ini merupakan pengembangan dari teknik PCR konvensional yang tidak hanya bertujuan untuk memperbanyak (mengamplifikasi) sekuens DNA target, tetapi juga secara bersamaan menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi pada setiap siklus reaksi. Teknologi ini memungkinkan proses kuantifikasi DNA dilakukan secara real-time, yaitu selama proses amplifikasi berlangsung, bukan hanya setelah reaksi selesai seperti PCR konvensional. Real-time PCR mengamplifikasi sekuens DNA target menggunakan prinsip dasar deteksi dengan teknik fluoresensi. Teknik ini di bagi menjadi dua (2) metode utama berdasarkan sistem deteksi yang

digunakan, yaitu yang menggunakan probe (penanda) dan tidak menggunakan probe. (1). Metode real-time PCR yang tidak menggunakan probe, menggunakan zat pewarna fluoresensi SYBR green, yang berikatan dengan double-tanded DNA (dsDNA) dan memancarkan sinyal fluoresen ketika interaksi tersebut terjadi. Semakin banyak produk DNA yang terbentuk, semakin kuat pula sinyal fluoresensi yang dihasilkan. (2). Metode real-time PCR yang menggunakan probe, melibatkan penggunaan probe berlabel fluoresen seperti probe FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) hibridisasi dan probe TaqMan. Probe ini dirancang khusus agar berikatan dengan sekuens DNA target yang sesuai, dan akan menghasilkan sinyal fluoresensi apabila berhasil terhibridisasi dengan DNA komplemen. Dalam setiap pengamatan proses PCR, sinyal fluoresensi yang dipancarkan akan meningkat secara proporsional pada setiap siklus PCR sejalan dengan bertambahnya produk DNA hasil amplifikasi. Pada PCR konvensional, deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dan DNA hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan gel elektroforesis. Berbeda dengan real-time PCR yang memungkinkan pengamatan langsung DNA yang diamplifikasi saat reaksi PCR pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe.

3. *Nested* PCR

Merupakan pengembangan dari metode PCR konvensional yang memiliki prinsip dasar serupa, yaitu memperbanyak sekuens DNA target. Namun, teknik ini dilakukan melalui dua tahap reaksi yang bertujuan

untuk meningkatkan spesifitas hasil amplifikasi dan mengurangi kemungkinan terbentuknya produk non spesifik akibat ikatan primer yang tidak sesuai. Dalam metode ini, digunakan dua pasang primer yang berbeda untuk dua putaran reaksi PCR yang dilakukan secara berurutan. Pada reaksi pertama, sepasang primer eksternal digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA target yang relatif panjang. Namun, produk dari tahap pertama belum tentu spesifik, karena adanya kemungkinan amplifikasi terhadap nontarget. Selanjutnya, sebagian kecil produk PCR dari tahap pertama akan digunakan sebagai cetakan (template) untuk reaksi PCR kedua. Pada tahap ini, digunakan pasangan primer internal (disebut juga primer “nested) yang menempel di bagian dalam sekuens yang telah diamplifikasi pada tahap pertama. Reaksi kedua ini menggunakan campuran reagen yang baru dan dirancang untuk mengamplifikasi bagian yang lebih spesifik dari produk DNA tahap pertama. Amplifikasi pada tahap kedua diharapkan dapat mengatasi uji PCR yang tidak optimal pada tahap pertama, sehingga dapat meningkatkan efisiensi dan kemampuan deteksi PCR.

Melalui pendekatan dua tahap ini, Nested PCR mampu meningkatkan efisiensi dan sensitivitas deteksi DNA secara signifikan, terutama pada sampel dengan konsentrasi DNA target yang sangat rendah atau mengandung banyak kontaminan. Teknik ini sangat berguna dalam mendeteksi DNA target dengan spesifitas tinggi, seperti da identifikasi mikroorganisme patogen atau analisis mutasi genetik.

4. *Multiplex PCR*

Multiplex PCR merupakan metode yang dapat mendeteksi beberapa gen target sekaligus dalam satu kali reaksi PCR. Metode ini menggunakan lebih dari satu pasang primer (primer forward dan reverse) secara bersamaan dalam satu kali reaksi PCR untuk mengamplifikasi berbagai fragmen DNA target yang berbeda dan menghasilkan produk dengan ukuran yang berbeda-beda sesuai dengan target yang dikenali oleh masing-masing primer. Multiplex PCR dapat dilakukan untuk deteksi dan identifikasi berbagai patogen penyebab infeksi campuran.

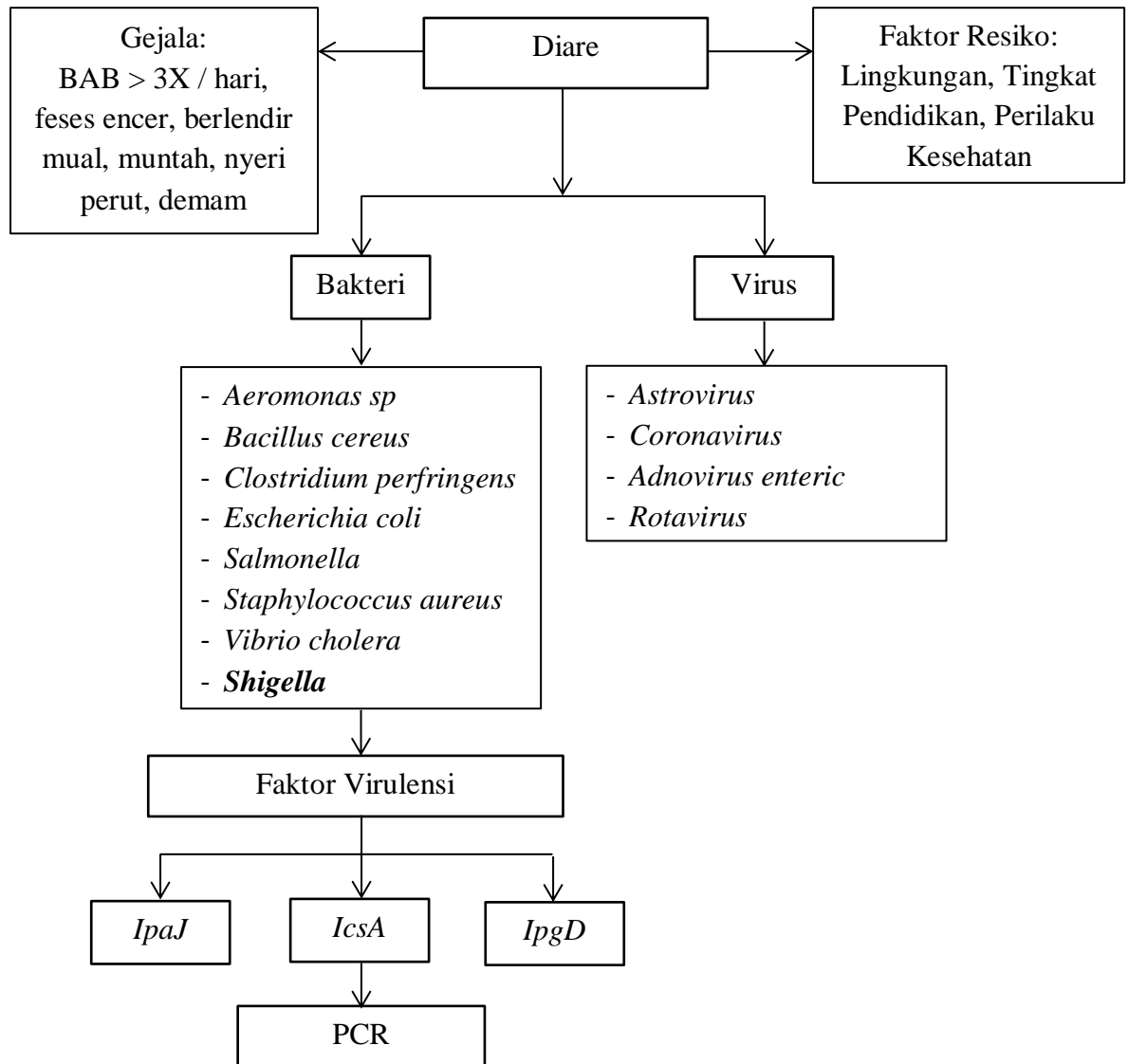
Keunggulan utama dari metode ini terletak pada efisiensi waktu dan biaya karena deteksi dan identifikasi terhadap beberapa patogen dilakukan bersamaan. Meskipun demikian, untuk melakukan optimasi multiplex PCR diperlukan waktu dan biaya yang lebih banyak. perancangan primer untuk multiplex PCR lebih kompleks, karena setiap primer yang digunakan harus mempunyai suhu melting yang sama dan spesifik terhadap target masing-masing. Penggunaan lebih dari satu pasang primer, menyebabkan uji multiplex PCR memberikan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih rendah daripada jenis PCR lain.

5. *Multiplex Nested PCR*

Multiplex nested PCR merupakan teknik yang menggabungkan dua metode PCR, yaitu *nested PCR* dan *multiplex PCR* yang bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifitas amplifikasi. Metode ini dapat dilakukan baik dengan menggunakan PCR konvensional maupun PCR

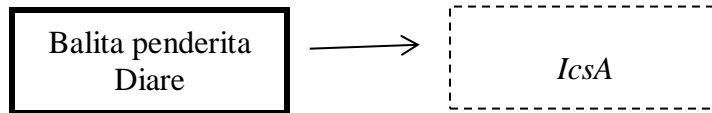
kuantitatif (real time). Pada metode ini, proses amplifikasi dilakukan sebanyak dua kali secara berurutan. Pada tahap pertama menggunakan sepasang primer eksternal untuk memperbanyak fragmen DNA target secara umum. Selanjutnya, sebagian kecil hasil amplifikasi dari tahap pertama digunakan sebagai template untuk reaksi PCR kedua, yang menggunakan primer internal yang lebih spesifik terhadap target. *Multiplex nested PCR* memungkinkan amplifikasi beberapa sekuens DNA sekaligus dalam satu rangkaian uji, baik dari gen target yang berbeda maupun dari gen yang sama tetapi pada lokasi yang berbeda. Kelemahan multiplex PCR yang cenderung memiliki sensitivitas dan spesifitas lebih rendah akibat kemungkinan interaksi antar primer, dapat ditingkatkan dengan *nested PCR*. Dengan demikian, *multiplex nested PCR* menjadi metode yang unggul untuk meningkatkan ketepatan dan efisiensi dalam deteksi genetik secara simultan (Effendi, 2018).

E. Kerangka Teori




Gambar 3. Kerangka Teori

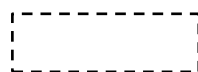
F. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep

Keterangan:

 = Variabel Dependen

 = Variabel Independen

G. Definisi Operasional

1. Diare adalah kondisi pada balita yang ditandai dengan buang air besar (BAB) tiga kali atau lebih dalam satu hari dengan konsistensi feses cair atau lebih encer dari keadaan normal, yang dapat disertai atau tidak disertai lender maupun darah.
2. Gen *IcsA* salah satu gen virulensi pada bakteri *Shigella* sp yang dapat menyebabkan diare.
3. *Shigella* sp adalah bakteri patogen usus dikenal sebagai agen penyebab penyakit disentri basiler. Bakteri ini menginfeksi saluran pencernaan dan menyebabkan berbagai gejala seperti nyeri perut, mual, muntah.
4. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu metode untuk meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah deskriptif laboratorik, yaitu penelitian yang dilakukan untuk menggambarkan keberadaan gen *IcsA* pada feses balita penderita diare, melalui pemeriksaan laboratorium menggunakan metode PCR.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024

2. Tempat Penelitian

Tempat pengambilan sampel dalam penelitian ini di RSUD Daya Kota Makassar dan untuk pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Makassar.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah penderita diare usia balita di RSUD Daya Kota Makassar yang memenuhi kriteria sampel inklusi.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah sampel feses sebanyak 13 sampel balita penderita diare. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dengan

metode purposive sampling yaitu melibatkan objek yang sesuai dengan kriteria penelitian.

D. Kriteria Subjek Penelitian

1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu:

- a. Balita dengan usia 0 – 5 tahun
- b. Diare berbentuk cair atau encer

2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini yaitu:

- a. Usia > 5 tahun
- b. Mengonsumsi antibiotik

E. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu pot sampel, coolbox, tabung eppendroft, timbangan precision balance, rak tabung, centrifuge, vortex, mikropipet tip, bead beating tube, inhibitor removal column, GD column, collection tube, water bath, mikrowave, thermocycler, cetakan gel agarosa, alat elektroforesis, gel doc.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu sampel feses balita, primer (F: 5'- ATG CAG GCA TTC TAA AAA TGC 3'; R: 5'- ACA GTG CCC TGT TTC AGG CG -3'), yellow tip, white tip, mix PCR (HS redmix, primer F dan R, Nuklease Free Water), DNA kit Geneaid (S1 buffer, S2 buffer, S3

buffer, wash buffer, elution buffer), bubuk agarosa, buffer TBE, ethidium bromide, DNA marker.

F. Prosedur Kerja

1. Cara Pengambilan Feses Diare

Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, diberikan pengarahan atau dijelaskan maksud dari pengambilan sampel feses kepada orang tua atau wali, setelah disetujui orang tua responden, diberikan pot sampel dan dipastikan pot sampel steril agar tidak ada kontaminasi lalu diminta orang tua pasien untuk menampung feses pada pot sampel yang telah diberikan.

2. Pemeriksaan Molekuler

a. Tahap Ekstraksi

Sampel feses diekstraksi menggunakan metode spin column. Hal pertama yang dilakukan yaitu ditimbang sampel feses sebanyak 0,2 g kedalam tabung Beadbeating Tube dan dipipet reagen ST1 Buffer sebanyak 800 µl kemudian dimasukkan ke dalam tabung Beadbeating Tube, lalu di vortex selama 10 menit dimana berfungsi agar terpisah dari kotoran yang ada pada sampel feses, selanjutnya diinkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi selama 2 menit, untuk menghilangkan busa yang disebabkan oleh detergen yang ada dalam ST1 Buffer. Setelah disentrifugasi diambil supernatnya sebanyak 500 µl di masukkan ke dalam tabung mikrosentrifius 1,5 mL.

Langkah selanjutnya, ditambahkan 150 µl ST2 Buffer ke dalam supernatan, kemudian di vortex selama 5 detik, lalu diinkubasi pada suhu 0-4⁰C selama 5 menit, kemudian disentrifugasi selama 3 menit untuk mengendapkan partikel yang tidak larut dan inhibitor PCR. Pindahkan supernatan sebanyak 500 µl kedalam Inhibitor Removal Column yang telah ditempatkan dalam tabung sentrifius 2 mL, lalu setrifugasi selama 1 menit. Buang column, simpan supernatant dan pindahkan supernatan ke dalam tabung mikrosetrifius baru.

Proses selanjutnya yaitu pengikatan DNA dengan ditambahkan ST3 Buffer sebanyak 800 µl ke dalam supernatan, lalu vortex selama 5 detik. Pindahkan 700 µl campuran sampel pada GD column yang telah di tempatkan pada collection tube 2 mL dan di sentrifugasi selama 1 menit. filtrat dibuang, dan di letakkan kembali GD column pada Collection tube 2 mL.

Untuk tahap pencucian, tambahkan 400 µl ST3 Buffer ke dalam GD column, lalu disentrifugasi selama 30 detik. Filtrat dibuang dan tempatkan kembali GD column ke dalam collection tube 2 mL. kemudian ditambahkan sebanyak 600 µl wash buffer dan disentrifugasi selama 30 detik, buang column lalu tempatkan kembali GD column kedalam collection tube 2 mL, tambahkan wash buffer sebanyak 600 µl, disentrifius selama 30 detik, filtrat dibuang, lalu tempatkan kembali GD column kedalam collection tube 2 mL, dilanjutkan pencucian kedua dengan tambahkan wash buffer sebanyak

600 μ l, disentrifugasi selama 30 detik, filtrat dibuang, lalu ditempatkan kembali GD column ke dalam collection tube 2 mL, lalu disentrifugasi kembali selama 3 menit, untuk mengeringkan column matrix.

Tahap terakhir adalah proses elusi, buang colum. Pindahkan GD column kedalam tabung mikrosentrifius 1,5 ml, kemudian ditambahkan 100 μ l elution buffer didiamkan selama 2 menit, disentrifius selama 2 menit untuk mengelusi DNA murni.

b. Amplifikasi DNA Dengan PCR

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan mencampurkan redmix sebanyak 212,5 μ l, primer *forward* sebanyak 8,5 μ l, primer *reverse* sebanyak 8,5 μ l, *nuclease free water* sebanyak 110,5 μ l, dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Campuran tersebut kemudian di *spin down*. Selanjutnya bagi masing-masing campura ke dalam strip tabung PCR sebanyak 5 μ l, kemudian ditambahkan 5 μ l DNA murni, *up down* dan dilanjutkan *spin down*.

Hasil mix kemudian dimasukkan mesin PCR *termocycler*. Tahap awal PCR adalah pra-denaturasi awal yang akan dilakukan pada 95⁰C selama 1 menit, denaturasi 95⁰ C selama 15 detik, kemudian annealing 55⁰C selama 15 detik, ekstension 72⁰C selama 30 detik dan final ekstension 72⁰C selama 7 menit. Selanjutnya penyimpanan. Hasil PCR selanjutnya dilanjutkan pada tahap elektroforesis.

c. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk memisahkan hasil amplifikasi DNA berdasarkan ukuran fragmen dengan menggunakan gel agarosa. Langkah pertama dengan melarutkan bubuk agarosa sebanyak 2 g kedalam 100 mL larutan buffer TBE 0,5x. Campuran tersebut dipanaskan menggunakan microwave hingga agarosa larut sempurna. Setelah larut, ditambahkan etidium bromide (EtBr) sebanyak 5 μ L ke dalam larutan agarosa, kemudian larutan gel agarose dituang dalam cetakan kemudian didiamkan hingga padat. Jika sudah padat, ditarik sisir dari cetakan dengan hati-hati, kemudian gel agarosa dipindahkan kedalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan buffer TBE 0,5x. Masukkan sampel PCR kedalam sumuran gel masing-masing sebanyak 5 μ L dan 5 μ L marker atau DNA ladder pada salah satu sumu sebagai pembanding ukuran. Untuk memulai pemeriksaan, hubungkan kabel hitam (-) dan merah (+) dari sumber arus listrik ke tengki elektroforesis, kemudian diatur voltase dan waktu running pada 100 V selama 60 menit kemudian tekan tombol RUN. Setelah selesai, diletakkan gel agarosa pada *gel documentation system* (gel doc) diatas UV transilluminator dan dinyalakan gel doc, untuk diamati pita-pita DNA yang tervisualisasi.

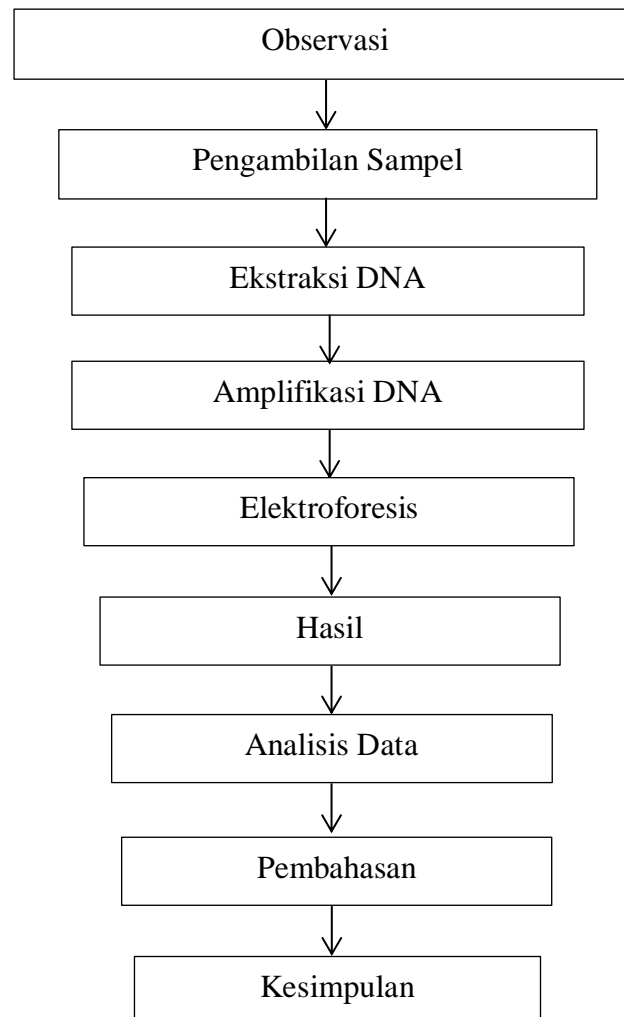
G. Interpretasi Hasil

Hasil positif ditandai dengan munculnya pita DNA saat pembacaan di GelDoc dengan band target yaitu 526 bp. Hasil negatif jika tidak terdapat pita band DNA saat visualisasi GelDoc.

H. Analisis Data

Analisis data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar yang kemudian akan dinarasikan.

I. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

J. Etika Penelitian

1. *Anonymity* yaitu nama responden tidak dicantumkan melainkan menggunakan kode atau inisial pada lembar pengumpulan data dan hasil penelitian.
2. *Confidentiality* yaitu data atau informasi yang didapat selama penelitian akan dijaga kerahasiaanya.
3. Sukarela tidak ada unsur paksaan atau tekanan secara langsung maupun secara tidak langsung dari peneliti kepada calon responden atau sampel yang akan diteliti.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Pada penelitian ini sampel yang digunakan diambil dari RSUD Daya Kota Makassar dengan jumlah sampel yang diteliti sebanyak 13 sampel yang diperoleh dari pasien balita penderita diare seperti pada Tabel 4.1. Selanjutnya penelitian dilakukan di *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUMRC) untuk ekstraksi DNA, amplifikasi PCR dan elektroforesis.

1. Karakteristik Responden Balita Penderita Diare

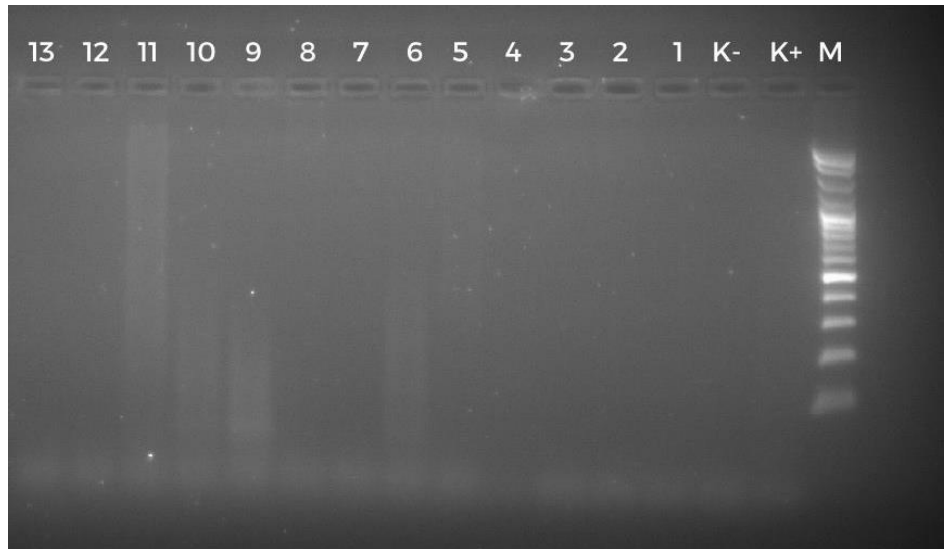
Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian

| Variabel | N | Presentasi (%) |
|-------------------------|----|----------------|
| 1. Jenis Kelamin | | |
| Laki-laki | 11 | 84,6% |
| Perempuan | 2 | 15,4% |
| 2. Usia | | |
| 0 – 5 bulan | 2 | 15,3% |
| 6 – 24 bulan | 10 | 76,9% |
| 25 – 59 bulan | 1 | 7,7% |

Berdasarkan Tabel 1. karakteristik subjek penelitian menunjukkan bahwa total subjek penelitian sebanyak 13 orang yang terdiri dari laki-laki sebanyak 11 orang dengan persentase (84,6%) dan yang berjenis kelamin perempuan sebanyak 2 orang dengan persentase (15,4). Sedangkan berdasarkan karakteristik subjek penelitian berdasarkan usia menunjukkan

pada kisaran usia 0 – 5 bulan sebanyak 2 orang dengan persentase (15,%), usia 6 bulan – 2 tahun sebanyak 10 orang dengan persentase (76,9%), usia 3 – 5 tahun sebanyak 1 orang dengan persentase sebanyak (7,7%).

2. Hasil Elektroforesis



Gambar 6. Hasil visualisasi elektroforesis dengan gen *IcsA* pada sampel balita penderita diare. Ket: K+ = kontrol positif, K- = kontrol negatif, 1-13= penomoran sampel

Berdasarkan hasil penelitian pada gambar 6. menunjukkan 13 sampel yang digunakan tidak terdeteksi adanya gen *IcsA*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya pita yang muncul pada ukuran 526 bp.

B. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan di *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Pada bulan Desember 2024. Proses pengumpulan sampel dilakukan di RSUD Daya Kota Makassar, sampel yang digunakan adalah sampel feses anak balita sebanyak 13 sampel. Dalam penelitian ini terdapat beberapa tahapan yang dilakukan,

mulai dari pengambilan sampel feses pasien diare rawat inap RSUD Daya Kota Makassar yang telah memenuhi kriteria inklusi dan bersedia mengisi kuisioner, apabila pasien atau orang tua pasien bersedia dan menyetujui jadi responden maka diberikan pot sampel yang telah diberi kode sebagai wadah penampung sampel serta memberikan arahan cara pengambilan sampel.

Karakteristik subjek penelitian seperti pada Tabel 1 berdasarkan jenis kelamin menunjukkan penderita diare berjenis kelamin laki-laki sebanyak 11 orang dengan persentase 84,6%, sedangkan perempuan sebanyak 3 orang dengan persentase 15,4%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Dewi, dkk (2023) yang dilakukan di RSUD Wangaya, Denpasar yang menunjukkan bahwa dari 106 balita penderita diare, 58 anak dengan persentase 54,7% berjenis kelamin laki-laki dan 48 anak dengan persentase 45,3% berjenis kelamin perempuan. Hal ini mengindikasikan bahwa balita berjenis kelamin laki-laki memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk mengalami diare dibandingkan balita berjenis kelamin perempuan. Beberapa faktor penyebab anak laki-laki lebih rentan terkena diare karena anak laki-laki cenderung lebih aktif secara fisik dan lebih sering bermain di luar ruangan, meningkatkan kemungkinan terpapar agen infeksi penyebab diare. Selain itu, perilaku seperti memasukkan tangan atau benda ke dalam mulut lebih sering diamati pada anak laki-laki, yang dapat meningkatkan risiko infeksi saluran cerna.

Selanjutnya karakteristik berdasarkan usia menunjukkan balita pada usia 0 – 5 bulan ditemukan sebanyak 2 orang dengan persentase 15,3%, pada usia 6

bulan – 24 bulan sebanyak 10 orang dengan persentase 76,9% dan pada usia 25 – 59 bulan sebanyak 1 orang dengan persentase 7,7%. Berdasarkan karakteristik ini menunjukkan bahwa sebagian besar balita penderita diare berada pada kelompok usia 6 bulan – 2 tahun. Hal ini sejalan dengan penelitian Sari, dkk (2024) karakteristik penderita diare akut ada anak usia 6-35 bulan di RS Bali Mandalika ditemukan diare paling banyak terjadi pada kelompok usia 6 sampai 12 bulan mencapai 42 orang dengan persentase 51,2% yang dilanjutkan dengan rata-rata usia 15 bulan. Jika dikelompokkan menjadi kelompok lebih besar, maka kelompok umur yang mendominasi adalah kelompok umur dibawah 24 bulan karena pada saat umur dibawah 2 tahun, kekebalan tubuh yang alami belum terbentuk sehingga sangat rentan dan memungkinkan mengalami infeksi. Pada usia 6 bulan juga bayi mulai diberi makanan pendamping Asi (MPASI) dan sudah mulai belajar merangkak sehingga mudah terkontaminasi dengan lingkungan sekitar.

Sampel yang telah dikumpulkan sesuai kriteria inklusi selanjutnya dilakukan pemeriksaan PCR. Tahapan PCR dimulai dari ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode spin column. Metode ini adalah Teknik pemurnian DNA yang memanfaatkan membran silika dalam kolom kecil untuk mengikat DNA secara selektif. Sampel yang telah dilisikan akan dilewatkan melalui kolom, kemudian dilakukan proses pencucian untuk menghilangkan protein dan kontaminan lainnya. Setelah itu, DNA murni akan dielusi menggunakan buffer. Metode ini sering digunakan karena prosesnya cepat, efisien, dan menghasilkan DNA dengan murni yang sesuai untuk reaksi

PCR. Selanjutnya hasil ekstraksi dilanjutkan dengan amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. Prinsip kerja metode PCR adalah memperbanyak fragmen DNA target dengan bantuan enzim DNA *polymerase* pada temperatur tinggi melalui siklus berulang. Proses ini memerlukan primer, yaitu oligonukleotida pendek yang berfungsi untuk menginisiasi sintesis DNA. Primer akan menempel pada untaian tunggal DNA setelah tahap denaturasi yaitu ketika suhu diturunkan agar terjadi proses *annealing*. Hasil PCR selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis.

Berdasarkan hasil visualisasi pada Gambar 6. menunjukkan bahwa dari 13 sampel yang digunakan, tidak ditemukan gen *IcsA*. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya pita pada ukuran 526 bp. Keberadaan gen *IcsA* sebagai penanda keberadaan *Shigella* sp. Hasil negatif dalam penelitian disebabkan sampel pasien yang digunakan tidak dalam keadaan demam, dimana untuk infeksi *Shigella* sp biasanya diawali dengan malaise diikuti oleh diare cair dan kram perut. Pada penelitian Rusdianto, dkk (2020) didapatkan 6 dari 50 sampel klinis yang terdeteksi gen *IcsA* dan penelitian ini sejalan dengan penelitian Alipour, dkk (2012) untuk mengetahui kemampuan set primer spesifik dalam mengkonfirmasi keberadaan gen *IcsA* dengan menggunakan beberapa jenis bakteri yakni *S. dysenteriae*, *S. Flexeneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *E. coli* (ATCC 43889) O157, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cerus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Clostridium perferingenes* yang menunjukkan bahwa gen *IcsA* hanya ditemukan pada

spesies bakteri *Shigella* sp. Temuan ini menegaskan bahwa gen *IcsA* merupakan penanda molekuler yang sangat spesifik untuk bakteri *Shigella*.

Berdasarkan penelitian (Zumsteg et al., 2014) menunjukkan bahwa *IcsA* memiliki dua peranan dalam proses patogenesis bakteri *Shigella*, yaitu sebagai protein adhesin yang memungkinkan bakteri menempel pada sel inang, serta sebagai mediator pergerakan intraseluler (*Actin Based Motility/ ABM*) yang mendukung penyebaran antar sel. Setelah menempel di sel epitel usus, *Shigella* memanfaatkan *IcsA* untuk membentuk ekor aktin (*actin tail*), yaitu struktur dari filamen aktin yang mendorong bakteri berpindah dari satu sel ke sel lainnya. Mekanisme ini memungkinkan *Shigella* menyebar secara langsung tanpa melewati ruang ekstraseluler, sehingga tidak mudah dikenali oleh sistem imun tubuh.

Proses pembentukan ekor aktin ini terjadi melalui interaksi *IcsA* dengan protein inang bernama N-WASP. *IcsA* akan mengaktifkan N-WASP, yang kemudian mengaktifkan protein lain yaitu Arp2/3, membentuk kompleks *IcsA* – N-WASP – Arp2/3. Kompleks ini memicu polimerisasi aktin, yaitu proses penyusunan filamen aktin. Filamen ini membentuk struktur seperti ekor (*actin tail*) yang mendorong bakteri menyebar dari satu sel ke sel lainnya tanpa harus ke ruang ekstraseluler (Nasser et al., 2022). Mekanisme ini tidak hanya mempercepat invasi bakteri, tetapi juga merusak lapisan epitel usus, terutama pada bagian sambungan antar sel (*tight junction*) yang berfungsi menjaga kestabilan dinding usus. Ketika struktur terganggu, terjadi peningkatan permeabilitas dinding usus yang menyebabkan kebocoran cairan dan elektrolit

ke dalam lumen. Akibatnya kemampuan usus menyerap air dan nutrisi terganggu, yang kemudian memicu terjadinya diare. Pada usia balita, kondisi ini menjadi lebih parah karena sistem imun dan permukaan usus yang belum berkembang sempurna.

Diare merupakan salah satu dari sepuluh besar penyakit yang paling sering dilaporkan oleh masyarakat setiap tahunnya, dengan angka kejadian yang relatif stabil dari tahun ke tahun. Kematian akibat diare umumnya terjadi karena kehilangan cairan dan elektrolit secara terus menerus akibat buang air besar yang berkepanjangan, yang kemudian menyebabkan dehidrasi. Tingkat keparahan diare dapat ditentukan dari seberapa sering frekuensi buang air besar terjadi dalam satu hari. Beberapa faktor yang mempengaruhi terjadinya diare antara lain adalah kontaminasi makanan dan minuman, sanitasi lingkungan yang buruk, keterbatasan akses air bersih, serta rendahnya pendidikan masyarakat.

Dalam penelitian ini, deteksi gen *IcsA* pada balita penderita diare masih memiliki keterbatasan, terutama dalam jumlah sampel yang digunakan. Selanjutnya perlu dilakukan penelitian dengan penggunaan sampel yang lebih banyak, untuk mendapatkan hasil yang lebih presentatif, karena penyebab diare tidak hanya disebabkan oleh bakteri tetapi juga virus atau parasit.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, sampel feses balita penderita diare menunjukkan tidak ditemukan gen *IcsA*. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya pita DNA pada ukuran 526 bp. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa diare pada sampel feses yang digunakan di RSUD Daya Kota Makassar tidak disebabkan oleh bakteri *Shigella* sp.

B. Saran

Saran dari peneliti bagi peneliti selanjutnya untuk menggunakan populasi sampel yang lebih banyak untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, F. (2018). *Isolasi Dan Identifikasi Shigella sp. Penyebab Diare Pada Balita*. 04(1), 7–12.
- Alifya, S., Erlina, Novita, A., Rustina, Daud, M. A., & Hennivanda. (2022). Deteksi Cemaran Bakteri Shigella sp. pada Ikan Kuniran (*Upeneus sulphureus*) di Pasar Al-Mahira Banda Aceh. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner (JIMVET)*, 6(4), 226–233.
- Alipour, M., Talebjannat, M., & Nabiuni, M. (2012). *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology Polymerase chain reaction method for the rapid detection of virulent Shigella spp.*
- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2015). *OPTIMASI SUHU ANNEALING PROSES PCR AMPLIFIKASI GEN shv BAKTERI Escherichia coli PASIEN ULKUS DIABETIK*. 10, 1–6.
- Anggraini, D., & Kumala, O. (2022). Diare Pada Anak. *Scientific Journal*, 1(4), 309–317. <https://doi.org/10.56260/sciENA.v1i4.60>
- Chrismasyanti, N. K. S. D., Suastini, K. D., Cawis, S. amoura, & Dewi, N. W. S. (2020). *Pengaruh Ekstrak Jahe Merah (Zingiber Officinale.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Shigella Dysentriae*. 17(2), 136–146.
- Dinkes. (2021). *Profil Kesehatan 2021 Provinsi Sulawesi Selatan*. Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan, Makassar.
- Dr. Syahran Wael, M. S. M., & Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, M. K. (2023). *Pengantar Biologi Molekuler*. Deepublish. <https://books.google.co.id/books?id=GGwrEQAAQBAJ>
- Effendi, I. (2018). *Pemeriksaan Molekular Treponema pallidum Harapan Universitas*. 24(68).
- Iqbal, A. F., Setyawati, T., Towidjojo, V. D., & Agni, F. (2022). Pengaruh Perilaku Hidup Bersih dan Sehat Terhadap Kejadian Diare pada Anak Sekolah. *Jurnal Medical Profession (MedPro)*, 4(3), 271–279. https://scholar.google.com/scholar?hl=id&as_sdt=0%2C5&q=pengaruh+perilaku+hidup+bersih+dan+sehat+terhadap+kejadian+diare+pada+anak+sekolah+fikry&btnG=#d=gs_qabs&t=1696865304362&u=%23p%3D-wqQKeVhBzMJ
- Jannah, M., Susanti, R., & Ismail AB. (2023). Faktor Yang Memengaruhi Kejadian Diare Pada Balita Di Indonesia Dengan Menggunakan Regresi Data Panel. *Prosiding Seminar Nasional Matematika, Statistika, Dan*

Aplikasinya,3(1),168.182.<http://jurnal.fmipa.unmul.ac.id/index.php/SNMSA/article/view/1181>

Kemendes, R. (2023). *Profil kesehatan indonesia 2022*.

Khairunnisa, D. F., Zahra, I. A., Ramadhania, B., Amalia, R., Kesehatan, F. I., Pembangunan, U., & Veteran, N. (2020). *Faktor risiko diare pada bayi dan balita di indonesia: a systematic review*. 172–189.

Kusnadi, J., & Arumingtyas, E. L. (2020). *Polymerase Chain Reaction (PCR): Teknik dan Fungsi*. Universitas Brawijaya Press. <https://books.google.co.id/books?id=SgcPEAAAQBAJ>

Kusnadi, J., Arumingtyas, E. L., & Hakiki, H. M. (2022). *Aplikasi Teknik PCR untuk Autentikasi Halal*. Universitas Brawijaya Press. <https://books.google.co.id/books?id=sGmuEAAAQBAJ>

Nasser, A., Mosadegh, M., Azimi, T., & Shariati, A. (2022). Molecular mechanisms of Shigella effector proteins: a common pathogen among diarrheic pediatric population. *Molecular and Cellular Pediatrics*. <https://doi.org/10.1186/s40348-022-00145-z>

Nugroho, K., Widyajayantie, D., Ishthifaiyyah, S. A., & Apriliani, E. (2021). Pemanfaatan Teknologi Droplet Digital PCR (ddPCR) dalam Kegiatan Analisis Molekuler Tanaman. *Jurnal Bios Logos*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.35799/jbl.11.1.2021.31101>

Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N. ., & Watiniasaih, N. L. (2015). OPTIMASI AMPLIFIKASI DNA MENGGUNAKAN METODE PCR (Polymerase Chain Reaction) PADA IKAN KARANG ANGGOTA FAMILI Pseudochromidae (DOTTYBACK) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi*, 19(2), 1–5. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/21254/14017>

Prawati, D. D., & Haqi, D. N. (2019). *Faktor Yang Mempengaruhi Kejadian Diare Di Tambak Sari , Kota Surabaya*. 34–45. <https://doi.org/10.20473/jpk.V7.I1.2019.35-46>


Purnamasari, L. (2019). *Identifikasi keberagaman bakteri penyebab diare pada anak dengan metode kultur*. 1(September), 57–62.

Qisti, D. A., Outri, E. N. E., Fitriana, H., Irayani, S. P., & Pitaloka, S. A. Z. (2021). *Analisis Aspek Lingkungan Dan Perilaku Terhadap Kejadian Diare Pada Balita Di Tanah Sareal*. 2(6), 1661–1668.

Rusdianto, Asfar, A., & Akbar, H. (2020). *Identifikasi Gen ICSA pada Feses Anak*

- Penderita Diare dengan Metode Polymerase Chain Reaction*. 3(3), 178–182. https://scholar.google.com/scholar?hl=id&as_sdt=0%2C5&q=pengaruh+perilaku+hidup+bersih+dan+sehat+terhadap+kejadian+diare+pada+anak+s+ekolah+fikry&btnG=#d=gs_qabs&t=1696865304362&u=%23p%3D-wqQKeVhBzMJ
- Salsabila, N., Permana, R. C., K, S. M., Romzalis, A. A., Ramadhani, D. N., & Rachmawati, Y. (2021). *Penentuan Sekuens Terbaik untuk Gen COI pada Crocodylus rhombifer Menggunakan SoftWare Perlprimer dan Primer Blast Sebagai Bentuk Praktikum Saat Pandemi Covid-19*. 2(1), 15–21.
- Sari, N., Erina, Abrar, M., Wardani, E., Fakhurrrazi, & Daud, R. (2018). *Isolasi Dan Identifikasi Salmonella sp Dan Shigella sp Pada Feses Kuda Bendi Di Bukit Tinggi Sumatra Barat*. 2(3), 402–410.
- Setiarto, R. H. B. (2020). *Teknologi Pengawetan Pangan Dalam Perspektif Mikrobiologi*. GUEPEDIA. <https://books.google.co.id/books?id=JmpNEAAQBAJ>
- Setyawan, D. A., & Setyaningsih, W. (2021). *Studi Epideomologi Dengan Pendekatan Aanalisis Spasial Terhadap Faktor-Faktor Resiko Yang Berhubungan Dengan Kejadian Diare Pada Anak Di Kecamatan Karangmalang Kabupaten Sragen*. Penerbit Tahta Media Grup.
- Siahaan, R. T. (2024). *Pengelolaan Klien dengan Diare Disertai Dehidrasi Berbasis Evidence Nursing di Ruang Dahlia RS Murni Teguh Sudirman*. 2(4).
- Siallagan, C. S., Syafi'i, M., Samaullah, M. Y., Susanto, U., Pramudyawardani, E. F., & Prastika, D. (2022). Visualisasi Gel Akilamida Sidik Jari DNA 49 Genotipe Padi 9Oryza sativa L) Menggunakan Marka SSr (Simple Sequence Repeat). *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 8(8). <https://doi.org/10.5281/zenodo.6605393>
- Siregar, B. C., Darwis, W., & Sariyanti, M. (2019). Uji Efektivitas Ekstrak Akar Tanaman Lauh Putih (Ficus racemosa L.) Terhadap Bakteri Escherichia coli dan Shigella dysenteriae Penyebab Diare. *Jurnal Kedokteran Raflesia*, 5(1), 53–63. <https://doi.org/10.33369/juke.v5i1.8778>
- Zumsteg, A. B., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., & Zychlinsky, A. (2014). IcsA is a Shigella flexneri adhesion regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell Host and Microbe*, 15(4), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.001>

Lampiran 1: Izin Pengambilan Sampel



LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT (LPPM)
UNIVERSITAS MEGAREZKY
 SK. Menristekdikti RI. No.1194/KPT/I/2018 Terakreditasi BAN PT

Kampus II - Jalan Antang Raya No. 43 Telp. 0411 - 492 401 - 496401 Fax. 496614 Website : <http://universitasmegarezky.ac.id> Email: info@universitasmegarezky.ac.id

Makassar, 25 November 2024

Nomor : 191 /07.091056/XI/2024
 Lampiran : -
 Perihal : **Rekomendasi Izin Pengambilan Sampel**

Kepada Yth :


Direktur RSUD Daya Kota Makassar

**Di -
Makassar**

Dengan hormat,
 Dalam rangka penyelesaian tugas akhir Mahasiswa Fakultas Kesehatan Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Megarezky Makassar, maka bersama ini kami mohon kiranya Bapak/Ibu berkenan menerima Mahasiswa (i) kami yang tersebut namanya di bawah ini untuk melakukan Pengambilan Sampel Penelitian di Instansi / wilayah kerja yang Bapak/Ibu Pimpin.

| | |
|----------------------------------|--|
| Nama | : Elfa Andriani |
| N I M | : BID123082 |
| Judul Skripsi/KTI | : Deteksi Gen IcsA Pada Penderita Diare Dengan Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) |
| Pembimbing | : 1. Nurfitri Arfani, S.Si., M.Si 2. Prof. Dr. Dra. Apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si |
| Tempat Pengambilan Sampel | : RSUD Daya Kota Makassar |

Demikian surat permohonan penelitian ini, atas bantuan dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.



Tembusan Kepada Yth:

1. Yang Bersangkutan
2. Arsip

Lampiran 2: Izin Penelitian



PEMERINTAH PROVINSI SULAWESI SELATAN
DINAS PENANAMAN MODAL DAN PELAYANAN TERPADU SATU PINTU
 Jl. Bougenville No.5 Telp. (0411) 441077 Fax. (0411) 448936
 Website : <http://simap-new.sulselprov.go.id> Email : ptsp@sulselprov.go.id
 Makassar 90231

| | | |
|----------|--------------------------|--|
| Nomor | : 27993/S.01/PTSP/2024 | Kepada Yth. |
| Lampiran | : - | Direktur HUM-RC RSP Univ. Hasanuddin Makassar |
| Perihal | : <u>Izin penelitian</u> | |

di-
Tempat

Berdasarkan surat Kepala LPPM Univ. Megarezky Makassar Nomor : 119/07.091056/XI/2024 tanggal 02 November 2024 perihal tersebut diatas, mahasiswa/peneliti dibawah ini:

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| N a m a | : ELFA ANDRIANI |
| Nomor Pokok | : B1D123082 |
| Program Studi | : Teknologi Laboratorium Medis |
| Pekerjaan/Lembaga | : Mahasiswa (D4) |
| Alamat | : Jl. Antang Raya No. 43 Makassar |



PROVINSI SULAWESI SELATAN

Bermaksud untuk melakukan penelitian di daerah/kantor saudara dalam rangka menyusun KARYA TULIS, dengan judul :

" DETEKSI GEN IcsA PADA PENDERITA DIARE DENGAN METODE POLYMERSE CHAIN REACTION (PCR) "

Yang akan dilaksanakan dari : Tgl. **04 November s/d 04 Desember 2024**

Sehubungan dengan hal tersebut diatas, pada prinsipnya kami **menyetujui** kegiatan dimaksud dengan ketentuan yang tertera di belakang surat izin penelitian.

Demikian Surat Keterangan ini diberikan agar dipergunakan sebagaimana mestinya.

Diterbitkan di Makassar
Pada Tanggal 04 November 2024

**KEPALA DINAS PENANAMAN MODAL DAN PELAYANAN TERPADU
SATU PINTU PROVINSI SULAWESI SELATAN**



ASRUL SANI, S.H., M.Si.
Pangkat : PEMBINA TINGKAT I
Nip : 19750321 200312 1 008

Tembusan Yth

1. Kepala LPPM Univ. Megarezky Makassar di Makassar;
2. *Pertinggal.*

Lampiran 3: *Informed Consent*

LAMPIRAN 1
SURAT PERSETUJUAN RESPONDEN
(INFORMED CONSENT)


Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Alesya.
Umur : Tgl 8 bulan 12 th.
Jenis Kelamin : ♀.

Menyatakan bersedia untuk menjadi responden demi kepentingan penelitian dengan ketentuan, hasil pemeriksaan akan dirahasiakan dan hanya semata-mata untuk kepentingan ilmu pengetahuan yang akan dilakukan dalam penelitian "**Deteksi Gen *IcsA* Pada Penderita Diare Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)**" yang dilakukan oleh Elfa Andriani, Mahasiswa Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Teknologi Kesehatan Universitas Megarezky Makassar.

Demikian surat pernyataan ini saya sampaikan, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Makassar, 2024

Responden

(.....**HARI YANTI**.....)

Lampiran 4: Kuisisioner

LAMPIRAN 2
FORMAT KUISISIONER

“Deteksi Gen *IcsA* Pada Penderita Diare Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*
(PCR)”

Nama : Alesya

Jenis Kelamin : P

Umur : 1 Tahun 11 bulan

1. Berapa lama penderita mengalami diare ? 3 Hari
2. Bagaimana konsistensi feses penderita ? Encer, Berlendir
3. Apakah penderita sedang mengkonsumsi antibiotik ? Tidak
4. Berapa lama mengkonsumsi antibiotik? Belum mengkonsumsi
5. Apa jenis antibiotik yang dikonsumsi? Tidak mengkonsumsi,
Minum Zinc, Domperidon e

Lampiran 5: Layak Etik



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES MAKASSAR**

Jalan Wijaya Kusuma Raya No. 46, Rappoccini, Makassar
E-mail: kepkipolkesmas@poltekkes-mks.ac.id



KETERANGAN LAYAK ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL EXEMPTION
"ETHICAL EXEMPTION"
No.: 0084/M/KEPK-PTKMS/1/2025

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The research protocol proposed by

Peneliti Utama : **Elfa Andriani**

Principal in Investigator

Nama Institusi : **Universitas Megarezky Makassar**
Name of the Institution

Dengan Judul:
Title

"Deteksi Gen IcsA Pada Penderita Diare Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)"

"IcsA Gene Detection in Diarrhea Patients Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Method"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.

Pernyataan Layak Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 30 Januari 2025 sampai dengan tanggal 30 Januari 2026.

Declaration of ethics applies during the period January 30, 2025 until January 30, 2026.



January 30, 2025
Professor and Chairperson,

Dr. Santi Sinala, S.Si, M.Si, Apt
Ketua KEPK Poltekkes Makassar

Lampiran 6: Surat Keterangan Selesai Penelitian

| | | |
|---|-------------------------|----------------------------|
|  <small>science for a better future</small> | ADMINISTRASI | FORMULIR 2 |
| | Nomor : 042/02/FR2/2025 | Tanggal : 26 Februari 2025 |
| SURAT KETERANGAN SELESAI PENGAMBILAN DATA/ ANALISA BAHAN HAYATI | | |

Dengan hormat,

Dengan ini menerangkan bahwa peneliti/mahasiswa berikut ini :

Nama : Elfa Andriani
 NIM : B1D123082
 Institusi : DIV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Megarezky
 Judul Penelitian : **Deteksi Gen IcsA Pada Penderita Diare Dengan Metode Polymerase Chain Reaction.**

Telah selesai melakukan pengambilan data/ analisa bahan hayati :

Pada tanggal : 25 Februari 2025
 Jumlah subjek : ± 15 sampel
 Jenis data : Data Primer

Dengan staf pendamping/pembimbing :

Nama : Zainul Muttaqin, M.BioMed
 Konsultan : -

Surat keterangan ini juga merupakan penjelasan bahwa peneliti/mahasiswa diatas tidak mempunyai sangkutan lagi pada unit/laboratorium kami.

Demikian surat ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Pendamping/Pembimbing



Zainul Muttaqin, M.BioMed
 NIP

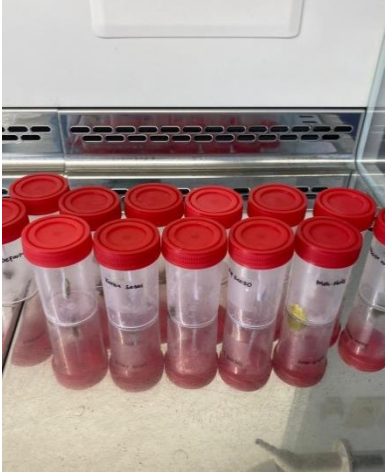
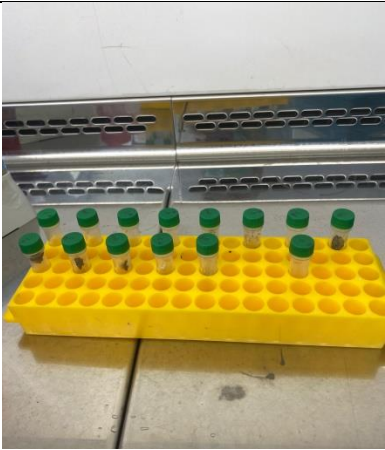

Mengetahui,
 Kepala Laboratorium,



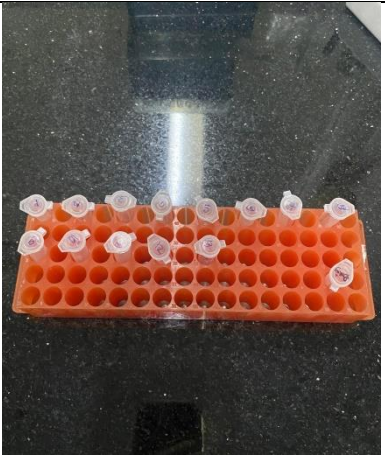
science for a better future


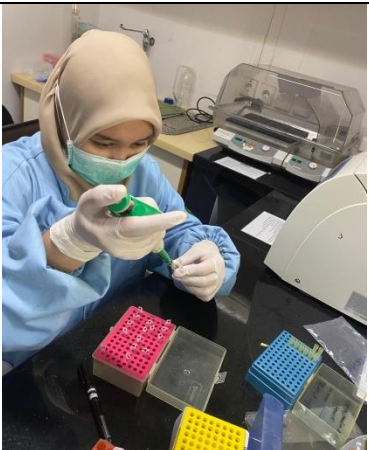

dr. Rusdina Bte Ladju, Ph.D
 NIP 198108302012122002

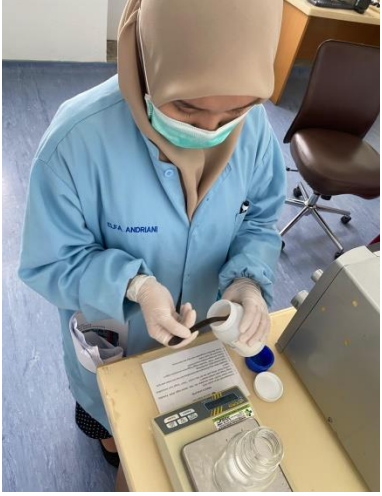
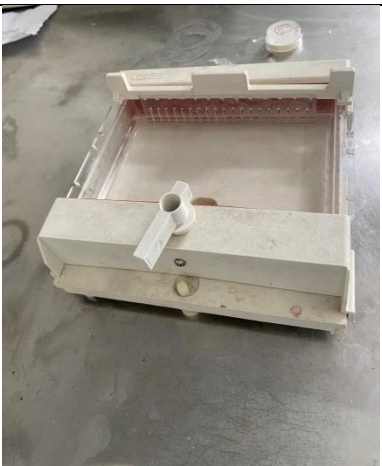
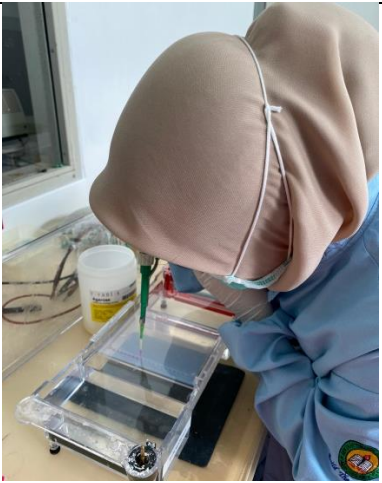


Lampiran 8: Proses Pengerjaan Sampel

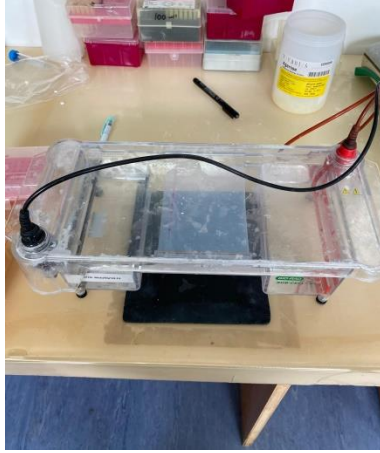
| No | Prosedur Pemeriksaan | Keterangan |
|----|---|--|
| 1. |  | |
| 2. |  | <p>Ditimbang sampel sebanyak 0,02 gram dan dimasukkan kedalam tabung Beadbeating</p> |
| 3. |  | <p>Ditambahkan 800 μl ST1 Buffer</p> |

| | | |
|----|---|---|
| 4. |  | Diinkubasi pada suhu 70 ^o selama 5 menit |
| 5. |  | Di Vortex selama 10 menit |
| 6. |  | Hasil ekstraksi |

| | | |
|----|---|---|
| 7. |  | Proses Mix PCR |
| 8. |  | Di mix sampel dalam tabung PCR dengan cara up down di lanjutkan spin down |
| 9. |  | Proses PCR |

| | | |
|-----|---|--|
| 10. |  | Proses penimbangan agarosa yang akan dilarutkan dengan TBE |
| 11. |  | Proses pencetakan gel agarosa |
| 12. |  | Proses mengisi sumuran dengan sampel, kontrol, dan marker |

13.



Proses elektroforesis