

**DETEKSI BAKTERI PENYEBAB JERAWAT**  
*Propionibacterium acnes* PADA *FOUNDATION* YANG  
DIGUNAKAN SECARA BERSAMA DENGAN  
MENGUNAKAN METODE PCR Gel-Base

**LAPORAN TUGAS AKHIR**

**DELIANA**

**13171095**



**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**  
**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS BHAKTI KENCANA**  
**BANDUNG**  
**2019**

**DETEKSI BAKTERI PENYEBAB JERAWAT**  
*Propionibacterium acnes* PADA FOUNDATION YANG  
DIGUNAKAN SECARA BERSAMA DENGAN  
MENGUNAKAN METODE PCR Gel-Base

**LAPORAN TUGAS AKHIR**

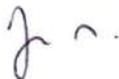
Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan  
Program Strata Satu

**DELIANA**  
**13171095**

Bandung, Juli 2019

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Ira Adiyati Rum, M.Si)

Pembimbing Serta



(Garnadi Jafar, M.si., Apt)

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Universitas Bhakti Kencana dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Universitas Bhakti Kencana.

*Dipersembahkan kepada kedua orang tua tercinta, kakak, abang, dan adik-adikku serta orang-orang yang mengasihiku.*

## ABSTRAK

### DETEKSI BAKTERI PENYEBAB JERAWAT *Propionibacterium acnes* PADA FOUNDATION YANG DIGUNAKAN SECARA BERSAMA DENGAN MENGUNAKAN METODE PCR Gel-Base

Oleh :  
Deliana  
13171095

**Latar Belakang.** Penggunaan *foundation* secara bergantian dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan mikroba baik patogen maupun non patogen. Adanya cemaran mikroba dapat menyebabkan tidak stabilnya sediaan *foundation* dan menyebabkan timbulnya infeksi bakteri penyebab jerawat pada kulit karena langsung kontak dengan kulit. Jerawat dapat disebabkan oleh kolonisasi mikroba *Propionibacterium acne*. **Tujuan.** Mendeteksi ada atau tidaknya kontaminasi bakteri penyebab jerawat yaitu *Propionibacterium acnes* pada sampel *foundation* yang digunakan secara bergantian dengan menggunakan metode PCR. **Metode.** Primer yang digunakan pada penelitian ini didesain menggunakan *software* Primer3. Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan hasil PCR antara kontrol positif *Propionibacterium acnes* dengan sampel *foundation* yang dilihat dari pita elektroforesis. **Hasil.** Hasil PCR menunjukkan dari 5 sampel *foundation* yang diperiksa terdapat 4 sampel yang memberikan hasil positif kontaminasi *Propionibacterium acnes*. Hasil tersebut ditunjukkan dengan munculnya pita yang sama antara sampel dengan kontrol positif sebagai pembanding. **Kesimpulan.** Pemakaian *foundation* secara bergantian berpotensi menyebabkan penyebaran bakteri penyebab jerawat dari satu pemakai ke pemakai kosmetik lainnya. Dari 5 sampel *foundation* yang diuji, 4 sampel diantaranya positif terkontaminasi bakteri *Propionibacterium acnes*.

**Kata Kunci :** *Propionibacterium acne*, Jerawat, *Foundation*,  
*Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

## **ABSTRACT**

### **DETECTION OF ACNE-CAUSING BACTERIA *Propionibacterium acnes* ON INTERCHANGEABLY FOUNDATION USED BY PCR Gel-Base METHOD**

**By :**

**Deliana**

**13171095**

**Background.** The use of foundation interchangeably can cause microbial growth both pathogenic and non-pathogenic. The presence of microbial contamination can cause unstable foundation preparations and causes infections of the bacteria that cause acne on the skin due to direct contact with the skin. Acne can be caused by microbial colonization of *Propionibacterium acne*. **Purpose.** Detect the presence or absence of contamination by acne-causing bacteria *Propionibacterium acnes* in foundation samples by PCR method. **Methods.** The primers used in this research were designed using Primer3 software. This research was conducted by comparing the PCR results between positive controls *Propionibacterium acnes* and foundation samples seen from electrophoresis bands. **Results.** PCR results showed from 5 foundation samples that have been checked, there were 4 samples that gave positive results of *Propionibacterium acnes* contamination. These results are indicated by the appearance of the same band between samples with positive controls as a comparison. **Conclusion.** The use of foundation interchangeably has the potential to cause the spread of acne-causing bacteria from one user to another cosmetic user. of this research is that there is contamination of *Propionibacterium acnes* in 4 foundation samples detected using the PCR method. Of the 5 foundation samples tested, 4 samples were positively contaminated with *Propionibacterium acnes* bacteria.

**Keywords :** *Propionibacterium acnes*, *Acne Vulgaris*, *Foundation*, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat dan kasih-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul **“DETEKSI BAKTERI PENYEBAB JERAWAT *Propionibacterium acnes* PADA FOUNDATION YANG DIGUNAKAN SECARA BERSAMA DENGAN MENGGUNAKAN METODE PCR Gel-Base”** dengan baik dan tepat pada waktunya.

Laporan Tugas Akhir ini dapat disusun dengan baik atas dukungan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku S.Turnip dan K.Sinaga yang telah mensupport baik mental maupun material. Terimakasih untuk kasih sayang, dukungan, dan bimbingan yang diberikan. Terimakasih karena selalu mendoakanku, selalu menasehatiku untuk menjadi lebih baik. Kalian adalah inspirasi ku dan semangat hidupku.
2. Ibu Ira Adiyati Rum, M.Si, selaku pembimbing utama, penulis mengucapkan terima kasih untuk setiap waktu yang telah diluangkan, saran, nasehat dan kesabarannya dalam membimbing penulis menyelesaikan Laporan Tugas Akhir ini.
3. Bapak Garnadi Jafar, M.Si., Apt, selaku pembimbing serta yang telah memberikan bimbingan, dan saran yang membangun untuk perbaikan sehingga terselesaikannya Laporan Tugas Akhir ini.
4. Kakak (Sarmi Heldina Turnip), Abang (Jhonri Turnip dan Renol Adianto Turnip) serta Adik (Britina Wati Turnip dan Doni anggertama Turnip) yang selalu mendukung saya. Terimakasih

atas dukungan, doa dan kasih sayang kalian. Terimakasih telah menjadi saudara yang selalu mendengarkanku dengan baik, memberiku nasehat dan semangat untuk terus belajar.

5. Segenap Dosen dan Staff Fakultas Farmasi atas ilmu dan bantuan yang diterima selama mengikuti perkuliahan di Universitas Bhakti Kencana.
6. Sahabat-sahabat yang telah memberi semangat dan membantu saya selama Tugas Akhir.
7. Rekan-rekan dari Fakultas Farmasi dan semua pihak yang telah banyak membantu dalam penyusunan Laporan Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Laporan Tugas Akhir ini masih banyak terdapat kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan. Atas segala kekurangan dan ketidaksempurnaan Laporan Tugas Akhir ini, penulis sangat mengharapkan masukan, kritik dan saran yang bersifat membangun kearah perbaikan dan penyempurnaan Laporan Tugas Akhir ini. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih. Semoga Laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bandung, Juli 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Perumusan Masalah.....	4
I.3 Batasan Penelitian .....	4
I.4 Tujuan Penelitian .....	5
I.5 Manfaat Penelitian.....	5
I.6 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	5
Bab II Tinjauan Pustaka.....	6
II.1 Akne Vulgaris.....	6
II.2 <i>Propionibacterium acnes</i> .....	10
II.3 <i>Polymerase Chair Reaction (PCR)</i> .....	11
II.4 Elektroforesis.....	21
Bab III Metode Penelitian.....	24
Bab IV Alat dan Bahan.....	25
IV.1 Alat .....	25
IV.2 Bahan.....	25
Bab V Prosedur Penelitian .....	26

V.1 Perencanaan Awal.....	26
V.2 Desain Primer dan Evaluasi Primer .....	27
V.3 Kultur Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> .....	28
V.4 Isolasi DNA Kontrol Positif dan Sampel <i>Foundation</i> .....	28
V.5 Amplifikasi Genom <i>Propionibacterium acnes</i> .....	30
V.6 Elektroforesis Gel Agarose.....	30
Bab VI Hasil dan Pembahasan .....	31
VI.1 Desain dan Evaluasi Primer .....	31
VI.2 Kultur Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> .....	38
VI.3 Isolasi DNA Kontrol Positif dan Sampel <i>Foundation</i> .....	40
VI.4 Hasil PCR dan Visualisasi Elektroforesis .....	42
BabVII Kesimpulan dan Saran.....	47
VII.1 Kesimpulan .....	47
VII.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN.....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 <i>Certificate of Analysis DNA Ladder</i> .....	55
Lampiran 2 <i>Certificate of Analysis dNTPs</i> .....	56
Lampiran 3 <i>Certificate of Analysis Loading Dye</i> .....	57
Lampiran 4 <i>Certificate of Analysis Diamond</i> .....	58
Lampiran 5 Surat Penegasan <i>Propionibacterium acnes</i> .....	59
Lampiran 6 <i>Certificate of Analysis Primer</i> .....	60
Lampiran 7 Alat-Alat yang Digunakan Pada Penelitian .....	61
Lampiran 8 Sampel Penelitian .....	62
Lampiran 9 Protokol Kit .....	63
Lampiran 10 Dokumentasi.....	65

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar II.1</b> Patogenesis Acne Vulgaris .....	9
<b>Gambar II.2</b> Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> .....	10
<b>Gambar II.3</b> Perbandingan PCR Konvensional dan Real Time...	17
<b>Gambar II.4</b> Proses Amplifikasi .....	19
<b>Gambar II.5</b> Tahapan PCR.....	20
<b>Gambar V.1</b> Alur Penelitian .....	26
<b>Gambar VI.1</b> FASTA <i>Propionibacterium acnes</i> recA gene .....	33
<b>Gambar VI.2</b> Hasil dari Primer3.....	33
<b>Gambar VI.3</b> BLASTING Primer .....	35
<b>Gambar VI.4</b> Hasil Primer BLAST.....	36
<b>Gambar VI.5</b> Hasil Uji Penempelan Primer pada <i>P.acnes</i> .....	39
<b>Gambar VI.6</b> Hasil Kultur <i>P.acnes</i> pada media MSA.....	40
<b>Gambar VI.7</b> Hasil Subkultur <i>P.acnes</i> pada media MSB.....	40
<b>Gambar VI.8</b> Hasil Isolasi DNA Kontrol Positif <i>P.acnes</i> .....	43
<b>Gambar VI.9</b> Hasil Isolasi DNA Sampel Foundation .....	43
<b>Gambar VI.10</b> Proses Amplifikasi PCR.....	44
<b>Gambar VI.11</b> Hasil PCR Kontrol Positif dan Sampel .....	45

## **Bab I Pendahuluan**

### **I.1 Latar Belakang**

Akne vulgaris (AV) atau jerawat adalah peradangan kronik folikel kelenjar pilosebacea dengan gambaran klinis berupa wujud kelainan kulit polimorfi, terdiri dari komedo, pustul, nodus, dan jaringan parut, baik jaringan parut yang hipotrofik maupun hipertrofik (Sitohang dan Wasitadmadja, 2016). Meskipun tidak mengancam jiwa, jerawat dapat mempengaruhi kualitas hidup seseorang dengan memberikan efek psikologis yang buruk berpacara seseorang menilai, memandang dan menanggapi kondisi dan situasi dirinya (Hafez *et al.*, 2009).

Penelitian yang dilakukan di Asia, menunjukkan prevalensi yang cukup tinggi. Prevalensi tertinggi pada wanita yaitu pada umur 14-17 tahun berkisar 83-85% dan pada pria yaitu pada umur 16-19 tahun berkisar 95-100%. Dari survey di kawasan Asia Tenggara, terdapat 40-80% kasus akne vulgaris sedangkan di Indonesia penderita jerawat terus meningkat. Menurut catatan studi dermatologi kosmetika Indonesia menunjukkan yaitu 60% penderita akne vulgaris pada tahun 2006, 80% pada tahun 2007 dan 90% pada tahun 2009 (Purwaningdyah dan Jusuf, 2013).

Etiologi pasti AV belum diketahui, namun ada beberapa faktor yang mempengaruhi terjadinya patogenesis AV, yaitu terjadinya perubahan pola keratinisasi dalam folikel, produksi sebum yang meningkat, peningkatan hormon androgen, anabolik, kortikosteroid, gonadotropin,serta ACTH pada kejadian stres psikis (Sitohang dan

Wasitatmadja, 2016). Penyebab AV multifaktorial, antara lain penggunaan kosmetik, kolonisasi bakteri, iklim, kebersihan, kejiwaan atau kelelahan, usia, ras, jenis kelamin dan genetik yang secara tidak langsung dapat memacu peningkatan proses patogenesis AV (Rao, 2016).

Akne vulgaris dapat disebabkan oleh kolonisasi beberapa mikroba antara lain *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*), *Staphylococcus epidermidis* dan *Pityrosporum ovale* (*Malassezia furfur*). *Propionibacterium acnes* merupakan salah satu bakteri gram positif berbentuk basil dan bersifat anaerob obligat. *Propionibacterium acnes* merupakan microbiota kulit yang biasanya sering ditemukan pada kulit yang kaya akan kelenjar sebacea seperti di kulit kepala dan muka, jumlah *Propionibacterium acnes* pada kulit terkait dengan aktivitas kelenjar sebacea, atau dengan kata lain jumlahnya meningkat setelah adanya pematangan fungsi kelenjar sebacea yaitu seiring masa pubertas. (Saising *et al.*, 2008).

Umumnya wanita menggunakan kosmetik dekoratif (*make-up*) yang dimaksudkan untuk menutupi hal-hal yang dapat mengurangi kecantikannya, seperti garis-garis penuaan (*fine-lines*), noda bekas jerawat (*acne scar*), serta untuk mengoreksi bagian-bagian wajah yang kurang baik. Kosmetik dekoratif yaitu : bedak dasar (*foundation*), bedak (*powder*), perona pipi (*blush-on*), *eyes shadow*, *eye liner*, pensil alis (*eye brow pencil*), *mascara*, pewarna bibir (*lipstick*), *lip liner*, pelembab bibir (*lipbalm*), dan *lipgloss* (Tranggono, 2014).

Penggunaan kosmetik bersama dengan orang lain atau digunakan secara bergantian dengan orang lain dan penyimpanan terlalu lama melebihi batas tanggal kadaluarsa dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan mikroba baik patogen maupun non patogen pada kosmetik tersebut. Adanya cemaran mikroba dapat menyebabkan tidak stabilnya sediaan dan menyebabkan timbulnya reaksi alergi, infeksi bakteri penyebab jerawat pada kulit, sensitifitas, dan penyakit kulit lainnya karena langsung kontak dengan kulit.

Banyak cara yang digunakan untuk mendeteksi bakteri patogen dan non patogen baik secara konvensional maupun cara modern seperti *polymerase chain reaction* (PCR) (Schaad et al., 2001). PCR merupakan metode molekular untuk menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang relatif singkat. Penggandaan tersebut tidak terlepas dari penggunaan enzim dan sepasang primer bersifat spesifik terhadap DNA target yang akan dilipatgandakan. Sehingga nantinya dapat digunakan untuk keperluan lain yang berkaitan dengan DNA. Komponen-komponen yang harus ada dalam proses PCR antara lain DNA cetakan yaitu potongan DNA yang akan dilipatgandakan, primer yaitu suatu potongan atau sequence dari oligonukleotida pendek yang digunakan untuk mengawali sintesis DNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, dan senyawa bufer (Erllich, 1989).

PCR Gel base memiliki prinsip yang sama seperti PCR pada umumnya yaitu dengan mengamplifikasikan DNA dan analisis hasil

amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. PCR gel base dapat dikatakan lebih murah dibanding dengan real time PCR, penggunaannya yang lebih sederhana, cepat serta memiliki sensitivitas dan spesifitas yang hampir sama baiknya dengan Real Time PCR hanya saja penggunaan PCR konvensional lebih menunjukkan hasil secara kualitatif (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

Pada penelitian ini akan dilakukan analisis untuk mendeteksi kontaminasi mikroba penyebab jerawat yaitu *Propionibacterium acnes* dan pada sediaan *foundation* yang digunakan secara bersama atau bergantian untuk mengetahui ada tidaknya cemaran mikroba penyebab jerawat yang terdapat pada *foundation* tersebut. Penelitian ini dilakukan dalam rangka meminimalisasi penggunaan kosmetik secara bersamaan dan tindakan perbaikan dalam penyimpanan agar tidak tercemar mikroba yang dapat menyebabkan penyebaran bakteri dari satu orang ke orang yang lain.

## **I.2 Perumusan Masalah**

Apakah terdapat cemaran mikroba *Propionibacterium acnes* pada *foundation* yang digunakan secara bergantian ?

## **I.3 Batasan Penelitian**

Pendeteksian mikroba *Propionibacterium acnes* pada *foundation* yang digunakan secara bersama menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction Gel Base*.

#### **I.4 Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui ada tidaknya cemaran mikroba penyebab jerawat yaitu *Propionibacterium acnes* pada *foundation* yang digunakan secara bergantian.

#### **I.5 Manfaat Penelitian**

1. Bagi Universitas Bhakti Kencana untuk menambah pengayaan literature tentang metode deteksi *Propionibacterium acnes* pada sediaan *foundation*.
2. Bagi peneliti menambah wawasan tentang teknik deteksi *Propionibacterium acnes* pada sediaan *foundation*.
3. Bagi masyarakat umum untuk membantu pencegahan infeksi *propionibacterium acnes* dari satu orang ke orang lain melalui *foundation* yang digunakan bersamaan atau bergantian.

#### **I.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Lokasi : Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana

Jl. Raya Soekarno Hatta No. 754 Cibiru Bandung 40617

Waktu : Februari – April 2019

## **Bab II Tinjauan Pustaka**

### **II.1 Akne Vulgaris (Jerawat)**

#### **II.1.1 Definisi Jerawat**

Acne vulgaris atau jerawat, merupakan reaksi peradangan folikel sebacea yang pada umumnya dan biasanya disertai dengan pembentukan papula, pustula, dan abses terutama di daerah yang banyak mengandung kelenjar sebacea (Wasiataatmaja, 2002). Jerawat adalah reaksi dari penyumbatan pori-pori kulit disertai peradangan yang bermuara pada saluran kelenjar minyak kulit. Sekresi minyak kulit menjadi tersumbat, membesar dan akhirnya mengering menjadi jerawat (Muliawan dan Suriana, 2013). Jerawat ada dalam berbagai bentuk, termasuk komedo, whitehead, papula, pustula, nodul, dan kista. Daerah – daerah predileksinya terdapat di muka, bahu, bagian atas dari ekstremitas superior, dada, dan punggung (Harahap, 2000).

#### **II.1.2 Epidemiologi**

Gangguan kulit berupa jerawat sering dianggap sebagai gangguan kulit yang timbul secara fisiologis, hal ini dikarenakan tidak ada seorang pun yang semasa hidupnya sama sekali tidak pernah menderita gangguan kulit tersebut (Efendi, 2003).

Angka kejadian acne vulgaris pada remaja merupakan angka kejadian terbesar. Acne vulgaris umumnya terjadi pada usia remaja, bervariasi antara 30 – 66% dengan puncak insiden yaitu 14 – 17 tahun pada wanita dan 16 – 19 tahun pada pria.

Berdasarkan survei yang dilakukan di kawasan Asia Tenggara, terdapat 40-80% kasus jerawat. Di Indonesia, menurut catatan kelompok studi dermatologi kosmetika Indonesia, terdapat 60% penderita jerawat pada tahun 2006 dan 80% pada tahun 2007. Berdasarkan kasus di tahun 2007, kebanyakan penderitanya adalah remaja dan dewasa muda yang berusia antara 11-30 tahun, sehingga beberapa tahun belakangan ini para ahli dermatologi di Indonesia mempelajari patogenesis terjadinya penyakit tersebut (Andy, 2009). Meskipun demikian, jerawat dapat terjadi pada usia lebih tua ataupun lebih muda dari usia tersebut (Efendi, 2003). Pada wanita jerawat dapat menetap sampai dekade umur 30-an tahun atau bahkan lebih. Pada pria umumnya jerawat lebih cepat berkurang, tetapi gejala yang lebih berat justru lebih sering terjadi pada pria (Cunliffe, 1989).

### **II.1.3 Patogenesis**

Patogenesis jerawat dipengaruhi banyak faktor (multifaktorial). Ada empat hal penting yang berhubungan dengan terjadinya jerawat, yaitu:

#### **1. Kolonisasi mikroorganisme di dalam folikel sebaceous**

Peran mikroorganisme penting dalam perkembangan jerawat. Kelompok mikroorganisme dari folikel pilosebacea yang berperan dalam patogenesis acne adalah *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Pityrosporum ovale*. Dari ketiga macam mikroorganisme ini yang paling besar perannya untuk kejadian acne adalah *P.acnes*. Mikroorganisme tersebut berperan pada kemosintesis inflamasi serta pada pembentukan enzim lipolitik pengubah fraksi lipid sebum. *Propionibacterium acnes* menghasilkan komponen aktif seperti lipase, protease, hialuronidase

dan faktor kemotaktik yang menyebabkan inflamasi. Lipase berperan dalam menghidrolisis trigliserida sebum menjadi asam lemak bebas yang berperan dalam menimbulkan hiperkeratosis, retensi dan pembentukan mikrokomedo.

## 2. Meningkatnya produksi sebum

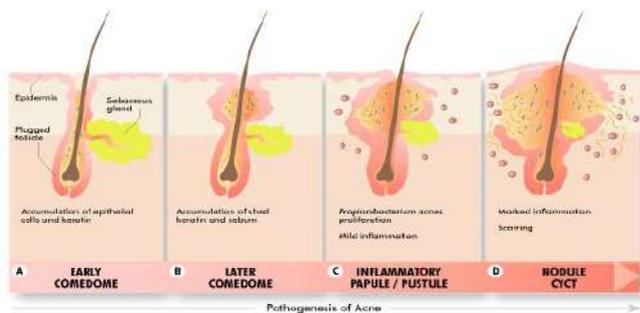
Gollnick (2003) menyatakan bahwa hormon androgen merangsang peningkatan produksi dan sekresi sebum. Peningkatan produksi sebum secara langsung berkorelasi dengan tingkat keparahan dan terjadinya lesi jerawat. Peningkatan produksi sebum menyebabkan peningkatan unsur komedogenik dan inflamatorik penyebab terjadinya lesi jerawat. Kelenjar sebacea dibawah kontrol endokrin. Pituitari akan menstimulasi adrenal dan gonad untuk memproduksi estrogen dan androgen yang mempunyai efek langsung terhadap unit pilosebaceus. Stimulasi hormon androgen mengakibatkan pembesaran kelenjar sebacea dan peningkatan produksi sebum pada penderita jerawat, hal ini disebabkan oleh peningkatan hormon androgen atau oleh hiperresponsif kelenjar sebacea terhadap androgen dalam keadaan normal.

## 3. Adanya proses inflamasi

*Propionibacterium acnes* mempunyai aktivitas kemotaktik yang menarik leukosit polimorfonuklear ke dalam lumen komedo. Jika leukosit polimorfonuklear memfagosit *Propionibacterium acnes* dan mengeluarkan enzim hidrolisis, maka akan menimbulkan kerusakan dinding folikuler dan menyebabkan ruptur sehingga isi folikel (lipid dan komponen keratin) masuk dalam dermis dan mengakibatkan terjadinya proses inflamasi (Fox, dkk, 2016).

#### 4. Hiperkeratinisasi Duktus Pilosebacea

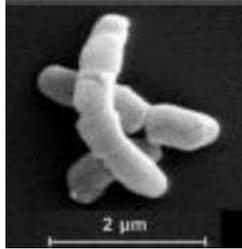
Penyebab dari hiperkeratosis ini belum jelas. Diduga hormon androgen berpengaruh terhadap proses keratinisasi. Penurunan kadar asam linoleat mempunyai korelasi terbalik dengan sekresi sebum. Penurunan kadar asam linoleat ini akan menyebabkan defisiensi asam lemak esensial lokal epitelium folikular yang menginduksi timbulnya hiperkeratosis folikuler dan penurunan fungsi barier epitel dari duktus pilosebacea. Adanya perubahan pola keratinisasi dalam folikel sebacea ini merupakan faktor yang berperan dalam timbulnya acne. Perubahan pola keratinisasi ini menyebabkan sel tanduk dari stratum korneum bagian dalam dari duktus pilosebacea menjadi lebih tebal dan lebih melekat dan akhirnya menimbulkan sumbatan dari saluran folikuler oleh masa keratin. Bila aliran sebum ke permukaan kulit terhalang oleh masa keratin akan terbentuk mikrokomedo. Mikrokomedo ini merupakan suatu proses awal dari pembentukan lesi acne. Mikrokomedo dapat berkembang menjadi lesi non inflamasi (komedo tertutup/terbuka) atau lesi inflamasi.



**Gambar II.1** Patogenesis *Acne Vulgaris*

([www.google.com](http://www.google.com) diakses pada tanggal 25 Oktober 2018)

## II.2 *Propionibacterium acnes*



**Gambar II.2** Bakteri *Propionibacterium acnes*

(Sumber : Dwidjoseputro, 1988)

### II.2.1 Klasifikasi ilmiah *Propionibacterium acnes*

Kingdom : Bacteria  
 Phylum : Actinobacteria  
 Class : Actino bacteridae  
 Ordo : Actinomycetales  
 Famili : Propionibacteriaceae  
 Genus : Propionibacterium  
 Spesies : *Propionibacterium acnes*  
 (Sugita *et al.*, 2010)

### II.2.2 Morgologi *Propionibacterium acnes*

Ciri penting dari *P.acnes* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan gram positif. Bakteri ini cepat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang atau filamen dengan dengan bentuk kokoid. *P. acnes* tidak hanya dianggap sebagai flora normal pada kulit yang normal tetapi juga bersifat sebagai bakteri patogen fakultatif. Bakteri jerawat ini merupakan

bakteri yang hidup tanpa menggunakan oksigen atau biasa disebut bakteri anaerob *P. acnes* pada umumnya tumbuh sebagai anaerob obligat walaupun beberapa strain atau jenis menunjukkan aerotoleran tetapi tetap menunjukkan pertumbuhan lebih baik sebagai anaerob. Bakteri ini mempunyai kemampuan menghasilkan asam propionat sebagaimana sesuai dengan namanya. Bakteri ini juga mempunyai kemampuan menghasilkan katalase, indola, dan nitrat.

*Propionibacterium* menyerupai *Corynebacterium* secara morfologi dan susunannya tetapi tidak toksigenik. Secara *in vitro*, *P. acnes* mampu bertahan selama 8 bulan di bawah kondisi anaerobik tanpa subkultur, menunjukkan bahwa ia juga dapat bertahan hidup di jaringan manusia pada potensi oksidasi rendah (*Csukas et al.*, 2004).

*Propionibacterium* berperan pada patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase yang mencegah asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya jerawat (Khan, 2009)

## **II.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

### **II.3.1 Definisi PCR**

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang merupakan komplementer dengan ujung 5' ke 3' dari dua untaian sekuen target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (Primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dicopy oleh DNA *polymerase* dan merupakan bagian awal

dimana proses amplifikasi berjalan ditandai dengan penempelan DNA Primer pada template DNA. Untuk mendukung terjadinya *annealing* primer ini pada template pertama kali diperlukan untuk memisahkan untai DNA substrat melalui pemanasan (Fatchiyah, 2006).

Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar  $10^6$ - $10^7$  kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Fatchiyah, 2006).

Saat ini, teknik-teknik molekuler sering digunakan untuk penelitian penyakit berbahaya. Salah satunya adalah pendekatan menggunakan informasi sekuen agen patogen yang diketahui untuk mengidentifikasi kekerabatannya dan mempelajari epidemiologinya. Kemajuan teknologi molekuler yang lain adalah amplifikasi genom dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) konvensional atau PCR degenerasi yang menjadi gold standard terbaru untuk mendeteksi beberapa mikroba. Polymerase Chain Reaction yang dulunya hanya sebagai teknologi untuk penelitian, sekarang telah dikembangkan sebagai aplikasi diagnostik rutin di laboratorium mikrobiologi klinik (Cockerill & Smith 2002). Polymerase Chain Reaction dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan reverse transcriptase terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul

complementary DNA (cDNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA dikenal dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

### **II.3.2 Jenis-Jenis PCR**

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan Real time. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis, sedangkan PCR real time jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur disetiap siklus proses PCR.

#### **II.3.2.1 PCR Konvensional**

Reaksi PCR konvensional biasanya menggunakan satu pasang primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi bagian tertentu dari genom agen infeksi serta dilakukan pada suatu tabung (Hewajuli and Dharmayanti, 2014). Primer PCR adalah oligodeoksiribonukleotida pendek, atau oligomer yang dirancang untuk melengkapi urutan akhir sekuen dari ampikon target PCR dan digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Proses amplifikasi RNA didahului dengan siklus reverse transcriptase (RT) yang berlangsung pada suhu 42-55°C serta dilakukan proses amplifikasi atau proses penggandaan DNA. Amplifikasi DNA target umumnya minimal diperlukan 25 siklus untuk dapat melipatgandakan satu copy sekuen DNA target sehingga hasil PCR dapat dilihat secara langsung dengan menggunakan agar elektroforesis.

Proses amplifikasi RNA didahului dengan siklus reverse transcriptase (RT) yang berlangsung pada suhu 42-55°C. Proses PCR

dibagi menjadi tiga tahap. Pertama, denaturasi cetakan DNA beruntai ganda pada suhu di atas 90°C sehingga menjadi DNA cetakan berantai tunggal. Kedua, penempelan (annealing) primer oligonukleotida ke DNA cetakan berantai tunggal biasanya pada suhu 50-60°C sehingga primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu dimana primer annealing biasanya diistilahkan dengan  $T_m$ . Ketiga, perpanjangan atau ekstensi fragmen DNA dengan enzim polimerase dan primer untuk menghasilkan kopi DNA yang dapat berfungsi sebagai DNA cetakan untuk siklus selanjutnya yang berlangsung pada suhu 70-78°C.

Kedua DNA cetakan asli dan target yang teramplifikasi selanjutnya berfungsi sebagai substrat untuk proses denaturasi, penempelan primer dan perpanjangan fragmen DNA. Berdasarkan teori, setiap siklus akan menggandakan jumlah kopi target DNA sehingga terjadi amplifikasi geometri. Amplifikasi DNA target sebanyak 25 siklus akan menghasilkan 33 juta kopi. Setiap penambahan 10 siklus menghasilkan 1024 lebih kopi. Rataan perubahan suhu atau tahapan lamanya inkubasi di setiap suhu dan jumlah waktu setiap siklus yang diulang, dikontrol dengan suatu program dari alat thermal cycler. Jumlah siklus amplifikasi PCR harus dioptimasi tergantung pada konsentrasi awal DNA target (Carman et al. 2000). Minimal diperlukan 25 siklus untuk dapat melipatgandakan satu kopi sekuen DNA target sehingga hasil PCR dapat dilihat secara langsung dengan menggunakan agar elektroforesis.

Keberhasilan proses PCR juga ditentukan oleh jenis enzim DNA polimerase yang digunakan. Enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim DNA polimerase idealnya harus tahan panas, mempunyai laju polimerisasi dan prosesivitas yang tinggi. Prosesivitas adalah kemampuan suatu enzim polimerase untuk menggabungkan nukleotida dengan suatu primer secara terus menerus tanpa terdisosiasi dari kompleks primer DNA cetakan.

### **II.3.2.2 PCR Real Time**

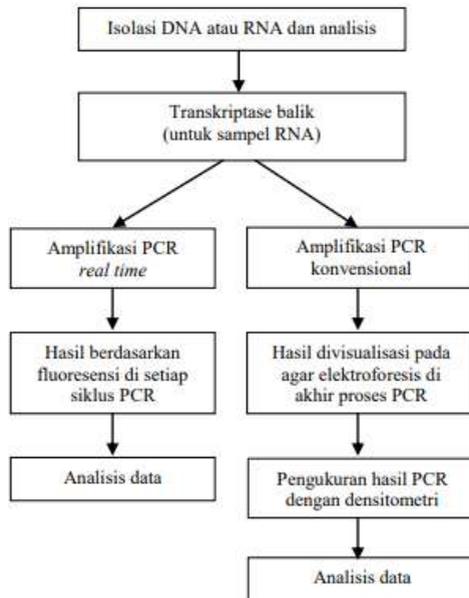
PCR Real time atau kuantitatif-PCR (qPCR) merupakan bentuk adaptasi lain dari metode PCR untuk menghitung jumlah penggandaan dari asam nukleat selama PCR. qPCR digunakan untuk menghitung DNA atau c-DNA, menentukan jumlah gen atau transkrip yang ada dalam sampel berbeda.

Prinsip kerja PCR real time adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi menggunakan sinar fluoresen. Sinar fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi. Hasil dari PCR Real time ini dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau. Peningkatan produk PCR yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal, 2010).

Polymerase Chain Reaction (PCR) real time tepat untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan

genotipe single nucleotide polymorphisms (SNP). Penggunaan probe yang spesifik membantu peningkatan spesifisitas pada pengujian PCR real time jika dibandingkan dengan pengujian PCR konvensional (Chantratita et al. 2008). Namun demikian, PCR real time juga mempunyai kelemahan yaitu memerlukan peralatan dan reagen yang mahal serta pemahaman teknik yang benar untuk hasil yang akurat.

Berbagai modifikasi PCR real time telah dikembangkan untuk meningkatkan kerja dari PCR real time seperti PCR real time multiplex. Saat ini, telah tersedia kit komersial untuk PCR real time multiplex yang memungkinkan untuk kombinasi beberapa pengujian dalam satu reaksi. Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex adalah amplifikasi secara berkelanjutan dua atau lebih DNA atau cDNA target dalam satu reaksi tabung dan hanya dapat dilakukan dengan menggunakan probe berlabel spesifik pada setiap urutan DNA target. Kelebihan dari PCR multiplex adalah jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga berguna apabila jumlah sampel yang tersedia dalam jumlah terbatas dan kemampuannya untuk menggabungkan pengujian dalam satu sistem internal kontrol (Belak 2007; Hoffmann et al. 2007).



**Gambar II.3** Perbandingan prosedur PCR konvensional dan PCR real time (Fraga *et al*, 2008)

Kedua prosedur pada gambar di atas dimulai dengan isolasi RNA atau DNA dilanjutkan dengan karakterisasi terhadap kemurniannya. Sampel RNA murni diawali dengan tahap transkripsi balik (reverse transcriptase) tetapi tahap ini tidak dilakukan apabila sampel berupa DNA murni. Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dengan menggunakan agar elektroforesis. Penandaan fragmen DNA dengan fluorescent dye dan intensitas pita DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin digital densitometri. Hal ini berbeda pada PCR real time, jumlah DNA diukur di setiap siklus proses amplifikasi PCR terutama pada fase eksponensial.

Deteksi akumulasi amplifikasi DNA pada PCR real time menggunakan probe DNA fluoresen. Walaupun demikian, analisis data hasil kedua prosedur tersebut baik PCR konvensional maupun real time memerlukan normalisasi data terhadap acuan yang diketahui untuk menentukan kualitas awal ekspresi target gen (Fraga *et al*, 2008).

### **II.3.3 Siklus PCR**

Metode PCR ini pada umumnya terjadi melalui 3 tahap. Siklus PCR yang biasa di gunakan sekitar 30 hingga 35 siklus, meliputi tahapan sebagai berikut :

#### **II.3.3.1 Proses Denaturation (suhu 95°C), selama 1 menit**

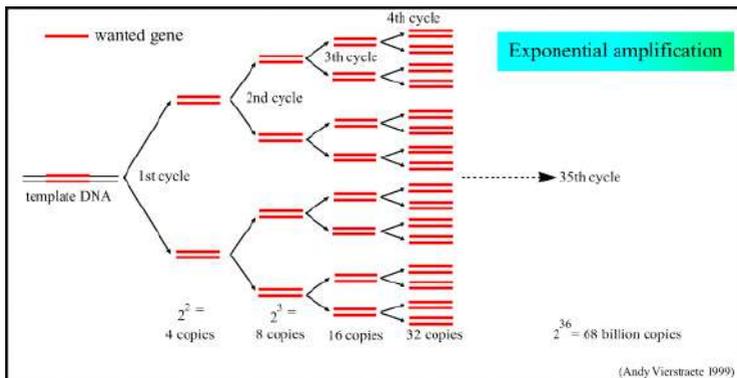
Pada umumnya sampel yang digunakan bisa berupa DNA ataupun RNA (mRNA). Jika sampel DNA, proses denaturasi ini membantu proses terjadinya pelepasan untai DNA dari untai ganda menjadi untai tunggal. Tetapi jika sampel yang digunakan RNA (mRNA), terdapat proses khusus yaitu merubahnya menjadi DNA dalam bentuk cDNA (complement DNA) dengan bantuan enzim Reverse Transkriptase.

#### **II.3.3.2 Proses Annealing/Penempelan primer (54-60°C), selama 45 detik**

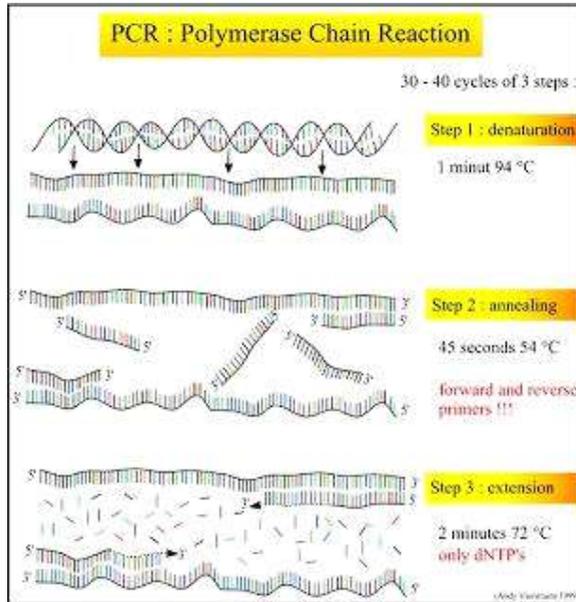
Merupakan proses Primer menempel pada template DNA sampel untuk memulai proses amplifikasi DNA. Primer ini berfungsi seperti enzim primase pada proses replikasi DNA yaitu tempat untuk memulainya proses replikasi dan DNA Polymerase memulai proses replikasi DNA.

### II.3.3.3 Proses Extension / Pemanjangan Primer (72°C) selama 2 menit

Proses ini menunjukkan proses pemanjangan yang dilakukan enzim DNA Polymerase. Di PCR, tugas DNA Polymerase diperankan oleh enzim Taq DNA polymerase yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (Taq). Enzim ini dikembangkan pada tahun 1988 dan merupakan enzim tahan panas sampai temperature mendidih 100°C. Proses Estention ini berjalan selama waktu tertentu, tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi (Fatchiyah, 2006).



**Gambar II.4** Proses Amplifikasi (Fatchiyah, 2006)



**Gambar II.5** Tahapan PCR (Fatchiyah, 2016)

### II.3.4 Komponen PCR

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah :

1. **DNA cetakan**, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 105 -106 molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
2. **Oligonukleotida primer**, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18-28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50-60%.
3. **Deoksiribonukelotida trifosfat (dNTP)**, terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion  $Mg^{2+}$  sehingga dapat

mengubah konsentrasi efektif ion. Ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.

4. **Enzim DNA Polimerase**, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari *Eubacterium* yang disebut *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
5. **Komponen pendukung lain** adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR berfungsi untuk menjamin pH medium karena reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20° C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> yang bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi untuk menstimulasi aktivitas DNA polimerase. MgCl<sub>2</sub> akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larut dengan dNTP serta konsentrasi MgCl<sub>2</sub> berpengaruh pada spesifitas.

#### II.4 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (elektro) sebagai penggerak molekul dari matriks penyangga berpori (*foresis*). Metode ini sangat umum digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan atau dibuat bermuatan (Fatchiyah, 2011). Teknik ini dapat digunakan untuk

memanfaatkan muatan listrik yang ada pada molekul misalnya DNA yang bersifat negatif. Molekul yang dapat dipisahkan antara lain DNA, RNA, atau protein. Jika suatu molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2006).

Elektroforesis DNA umumnya menggunakan metode elektroforesis gel agarosa (Karp, 2008). Elektroforesis DNA dilakukan misalnya untuk menganalisis fragmen-fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Fragmen molekul DNA yang telah dipotong-potong dapat ditentukan ukurannya dengan cara membuat gel agarosa, yaitu bahan semi-padat berupa polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut. Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya dalam suatu buffer. Agar dapat larut dengan baik, pelarutannya dibantu dengan pemanasan hingga gel agarosa dalam keadaan cair sehingga mudah dituang ke atas lempeng, dan sebelum mendingin dibuat sumuran dengan menggunakan perspex menyerupai sisir yang ditancapkan pada salah satu ujung gel yang masih cair. Sehingga ketika gel memadat, terbentuklah sumuran-sumuran kecil. Kedalam sumuran inilah nantinya molekul DNA dimasukkan (Yuwono, T., 2006).

Agarosa merupakan polisakarida yang terdiri dari unit agarobiosa. Konsentrasi agarosa biasa digunakan antara 1-3%. Ukuran pori gel bergantung pada konsentrasi agarose, semakin tinggi konsentrasi agarosa maka semakin kecil ukuran pori. Sebaliknya, semakin