

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Design Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif dan dianalisa secara statistik, dikarenakan karean peneliti ingin mengetahui gambaran terhadap suatu keadaan secara objektif.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah pasien dengan diagnosa demam tifoid disertai dengan hasil positif pada kultur di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Sidoarjo.

4.2.2. Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat dari Rumah Sakit Umum Sidoarjo dengan kriteria sebagai berikut ;

1. Kriteria Inklusi :
 - a. Pemeriksaan serologi uji widal memberikan hasil positif atau uji Rapid IgG/IgM *Salmonella typhi* positif
 - b. Isolat dari kultur *Salmonella thypi* yang positif
2. Kriteria Eksklusi :
 - a. Penderita dengan diagnosa klinis selain demam tifoid
 - b. Penderita demam tifoid yang disertai dengan penyakit infeksi lainnya

4.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1. Lokasi Penelitian :

1. Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Sidoarjo
2. Institute of Tropical Disease Surabaya

4.3.2. Waktu Penelitian :

1. Maret 2022 sampai dengan Mei 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Sidoarjo
2. Mei 2022 sampai dengan Juni 2022 di Institute of Tropical Disease Surabaya

4.4. Definisi Operasional

1. Pasien dengan diagnosa demam tifoid merupakan subjek dalam penelitian ini. Diagnosa tersebut ditunjang dari hasil pemeriksaan laboratorium diantaranya ialah ; uji widal, uji rapid IgG/IgM, uji Elisa, uji tubex, uji bakteriologi berupa kultur.
2. Pada penelitian ini subjek yang digunakan adalah pasien dengan hasil pemeriksaan bakteriologi kultur positif. Kultur merupakan gold standard dalam penegakan diagnose demam tifoid. Sensitivitasnya bergantung pada terapi antibiotik yang diterima, rasio volume darah dengan media yang dipakai. Biasanya presentasi hasil positif dengan potensi tinggi ditemukan pada minggu pertama paska infeksi sekitar 70-90%, kemudian mengalami penurunan setelah beberapa hari.

3. Antigen OMP merupakan salah satu komponen *envelope* dari bakteri *Salmonella thypi* yang mengisi hampir separuh bagian dari membrane luar. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa protein spesifik OMP merupakan immunogen yang baik dalam menginduksi kekebalan tubuh seseorang. Sehingga identifikasi dari antigen ini dapat menjadi informasi yang dapat dikembangkan dalam perkembangan metode pemeriksaan laboratorium terhadap infeksi bakteri *Salmonella thypi* kedepannya.

4.5. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data penelitian ini adalah *purposive sampling*. Pasien rawat inap di Rumah Sakit Umum Sidoarjo dengan hasil pemeriksaan serologi uji widal positif dan diagnosa berupa demam tifoid.

4.6. Tahapan Penelitian

4.6.1. Persiapan Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|---------------------------------|------------------------|
| 1. Tabung reaksi | 5. Shaking Incubator |
| 2. Cawan petri | 6. Alat Elektroforesis |
| 3. Refrigerated ultracentrifuge | 7. Eppendorf |
| 4. Refrigerated centrifuge | 8. Tabung Konikel |

b. Bahan

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1. Phosphate buffer saline pH 7,4 | 4. Media luria bertani agar |
| 2. Triton X-100 | 5. <i>cormasic blue</i> |
| 3. Media NB | 6. <i>Destaining solution</i> |

4.6.2. Prosedur

1. Perbanyak Kuman *Salmonella typhi*

- a. Isolat dari media Mac-Conkey yang telah teridentifikasi *Salmonella typhi* positif, ditanam kembali ke media luria bertani agar untuk memperbanyak jumlah bakteri
- b. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
- c. Suspensikan isolat murni pada media Nutrient Broth
- d. Setelah 7 – 8 jam sel bakteri pada media disentrifus pada kecepatan 6000rpm selama 15 menit untuk mengendapkan kuman
- e. Endapan kuman disuspensikan dengan phosphate buffer saline (PBS, pH 7,4) (Verdugo-Rodriguez et al., 1993).

2. Isolasi OMP

(Endapan kuman dalam PBS dikirim ke Laboratorium *Institute Tropical Disease* Surabaya menggunakan box tertutup yang dipertahankan suhunya dalam suhu kamar dengan waktu kirim kurang dari 12 jam untuk dilakukan sonikasi)

- a. Sonikasi dengan pengaturan 35kHz selama 30 detik dengan jeda 1 menit, serta diulang sebanyak 15 kali

- b. Sel hasil sonikasi kemudian disentrifus dengan kecepatan 1400 g pada suhu 4°C selama 10 menit
- c. Supernatan yang didapatkan disentrifus kembali dengan kecepatan 100.000 g pada suhu 4°C selama 30 menit
- d. Endapan kemudian diresuspensi pada 20 mL phosphate buffer saline pH 7,4 yang mengandung 2% Triton X-100 dan diinkubasi pada suhu 37 C selama 20 menit
- e. Tahapan D diulangi kembali
- f. Endapan yang didapatkan diresuspensi pada 1 mL phosphate buffer saline dan disimpan pada suhu -20°C hingga saatnya untuk digunakan
- g. Untuk mengetahui konsentrasi protein dari hasil preparasi OMP didapatkan menggunakan metode nanodrop A280

3. Elektroforesis

Analisa antigen OMP dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE 12% gel *polyacrylamide*

- a. Pada sumuran sampel diisi 10µL
Pada sumuran protein marker diisi dengan 5µL
- b. Elektroforesis dilakukan paa 150v, 400mA selama 60 menit
- c. Setelah selesai lakukan pewarnaan gel menggunakan *commasive brilliant blue* pada shaking incubator di suhu ruang selama 24 jam
- d. Destaining dengan larutan destaining (methanol dan asam asetat glacial) pada shaking incubator sampai terlihat pita-pita protein (Murwani et al., 2002).

4.7. Metode Analisis Data

Dari hasil elektroforesis, dihitung berat molekul proteinnya melalui fraksi pita protein yang terbentuk dibandingkan dengan marker menggunakan *Gel Analyzer 19,0*.

4.8. Kerangka Penelitian

