

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah deskriptif kuantitatif dan rancangan penelitian adalah post-test design, serta analisis data dengan metode observasi gen *Coa* swab ulkus pada pasien diabetes melitus yang ada di Rumat Spesialis Luka Diabetes Melitus dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah semua pasien diabetes mellitus jenis kelamin laki-laki dan perempuan di Rumat Spesialis Luka Diabetes Apotek Kimia Farma Banyu Urip II, Jl. Banyu Urip No.213, Banyu Urip, Kec. Sawahan, Kota SBY, Jawa Timur dan Jl. Dharmahusada No.111, RT.05/RW.01, Mojo, Kec. Gubeng, Kota SBY, Jawa Timur 60285.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini swab ulkus diabetikum pada pasien diabetes mellitus di Rumat Spesialis Luka Diabetes.

4.2.2.1 Kriteria Inklusi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari isolat swab luka pasien diabetes mellitus di Rumat Spesialis Luka Diabetes yang ditemukan adanya bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi Sampel

Sampel yang tidak digunakan dalam penelitian ini adalah sampel swab luka pasien diabetes mellitus yang pada saat di kultur tidak ditemukan bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

4.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2021 sampai bulan Mei 2022

4.3.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel ulkus diabetikum yang diambil dari Rumat Spesialis Luka Diabetes di Apotek Kimia Farma Banyu Urip, Kendangsari, Waru, dan Dharmahusada ; Isolasi dan identifikasi MRSA dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Surabaya ; Deteksi gen *Coa* dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Surabaya.

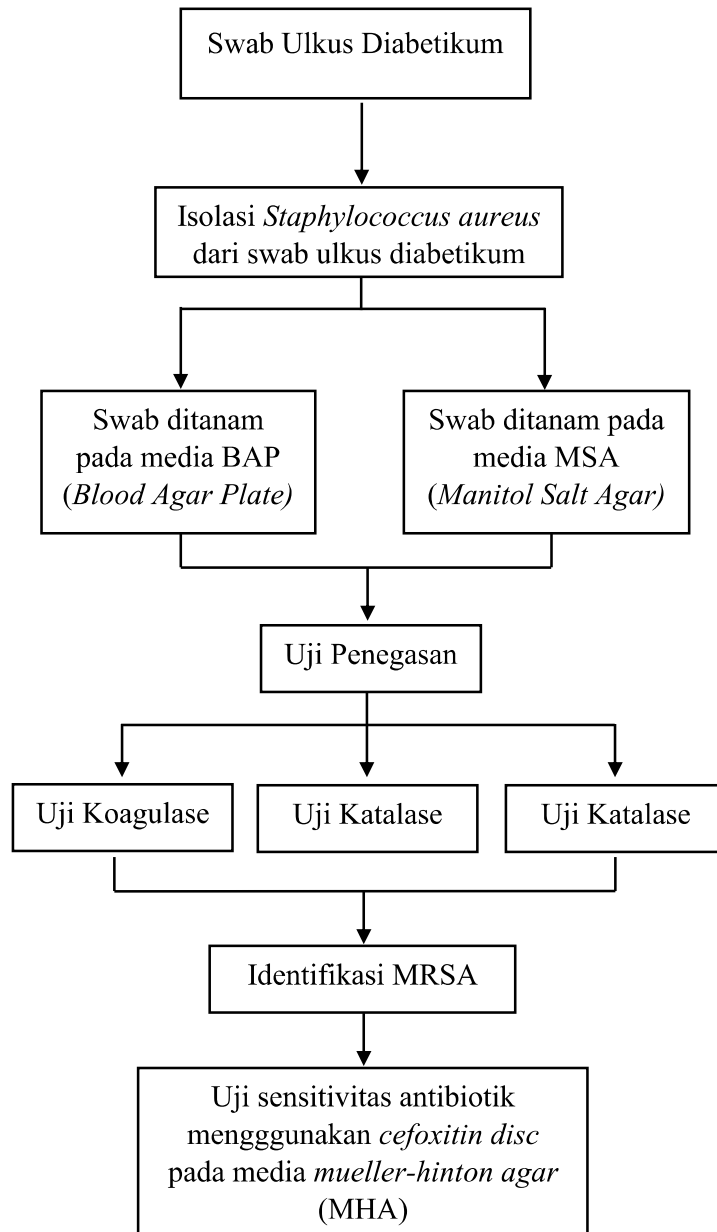
4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian

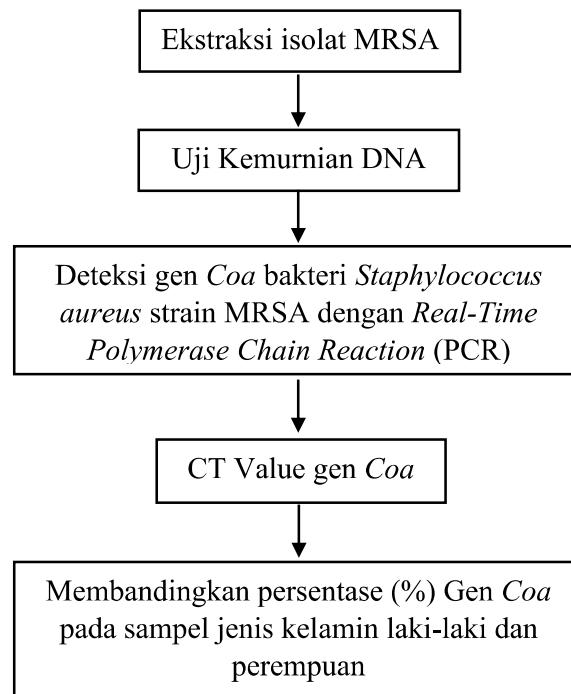
Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Ulkus diabetikum	Luka pada penderita diabetes mellitus cenderung sulit untuk disembuhkan dan rentan mengalami infeksi karena tinggi nya gula darah yang menjadi nutrisi untuk pertumbuhan bakteri
2. <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Strain bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang mengalami mutasi dan resisten terhadap antibiotik golongan β -laktam salah satunya

	yaitu metisilin
3. Gen <i>Coa</i>	Gen <i>Coa</i> sebagai pengkode dari virulensi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>

4.5 Kerangka Operasional Penelitian





Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan :

Dari isolat swab luka pasien diabetes mellitus dilakukan kultur bakteri untuk mendapatkan bakteri *Staphylococcus aureus*, kemudian dilanjutkan dengan mendeteksi gen *Coa* dengan menggunakan metode PCR dari proses ekstraksi DNA, hingga amplifikasi DNA untuk mendeteksi adanya gen *Coa* pada bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA. Kemudian membandingkan persentase (%) gen *Coa* pada sampel jenis kelamin laki-laki dan perempuan.

4.6 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini menggunakan Teknik mengumpulkan data secara observasi atau pengambilan secara langsung dengan mengamati ada atau tidaknya gen *Coa* pada bakteri *Staphylococcus aureus* Strain *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel isolat swab luka diabetes mellitus dari Rumat Spesialis Luka Diabetes Surabaya di kec. Sawahan dan kec. Gubeng. Bahan tambahan yang digunakan dibagi menjadi dua yaitu untuk isolasi dan identifikasi MRSA serta untuk identifikasi gen *Coa*. Untuk isolasi dan identifikasi MRSA membutuhkan media *chromogenic MRSA agar based cefoxitin*, H₂O₂ 3%, plasma citrate, fuchsin, gentian violet, alkohol, lugol dan air. Bahan yang digunakan untuk deteksi gen *Coa* ialah kit ekstraksi, *PCR mastermix*, primer gen *Coa*, agarose gel, TAE, *loading dye*, *ethidium bromide* dan *marker*.

4.6.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian dibagi menjadi dua yaitu untuk isolasi dan identifikasi MRSA serta untuk deteksi gen *Coa*. Untuk isolasi dan identifikasi MRSA memerlukan petridisc, tabung darah Na. citra, *object glass*, jarum ose, bunsen, sentrifus, mikroskop dan inkubator. Untuk deteksi gen *Coa* memerlukan alat *Bio Safety Cabinet*, *hot plate*, *microsentrifuge*, *microtube*, freezer -80°C, PCR, dan vortex.

4.6.3 Prosedur Kerja

4.6.3.1 Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus*

Swab ulkus diabetikum ditanam pada media *chromogenic agar based cefoxitin* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37°C dalam keadaan anaerob. Koloni MRSA akan berwarna biru, *Staphylococcus aureus* dan bakteri lainnya tidak dapat tumbuh. Untuk uji penegasan dilakukan pewarnaan gram, uji katalase dan koagulase sehingga terhindar dari positif palsu.

4.6.3.2 Ekstraksi DNA Bakteri *Staphylococcus aureus*

DNA dari bakteri *Staphylococcus aureus* diekstraksi dari sampel dengan metode *chloroform-phenol*. 1,5 ml kultur bakteri diambil dan di sentrifuge. Hasil dari sentrifuge berupa endapan (pellet) ditambahkan dengan 1000 μ l DNAzol dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 20 menit, setelah itu tambahkan 200 μ l *chloroform* kemudian di vortex. Kemudian 600 μ l isopropanol ditambahkan dan disentrifuge. Pellet dicuci dengan etanol 75% dan dikeringkan. Pellet DNA disimpan dalam *nuclease free water* dan pellet tersebut sebagai DNA template pada PCR. Kemudian hasil ekstraksi DNA tersebut diukur kemurniannya

4.6.3.3 Uji Kemurnian DNA Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel DNA dari hasil ekstraksi diuji kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang rasio 260 nm. Masing-masing panjang gelombang spektrofotometer dikalibrasi dengan menggunakan blanko aquadest steril. Sampel DNA diukur absorbansinya pada panjang gelombang tersebut. Dengan rumus *Optical Density* (OD) 260/280, jika hasilnya 1,8-2,0 maka tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan tinggi dan dapat digunakan lebih lanjut. Interpretasi hasil dari nilai perbandingan OD 260/280 nm adalah sebagai berikut :

OD rasio 260/280 < 1,8 $\longrightarrow$ Terkontaminasi protein

OD rasio 260/280 + 1,8-2,0 $\longrightarrow$ Tingkat kemurnian DNA tinggi

OD rasio 260/280 > 2.0 $\longrightarrow$ Terkontaminasi RNA

4.6.3.4 Identifikasi Gen *Coa*

Gen koagulase diamplifikasi dengan menggunakan dua urutan primer dengan menggunakan forward primer : 5' ATAGAGATGCTGGTACAGG 3' dan reverse primer: 5' C GCTTCCGATTGTTCGATGC 3'. Isolat *Staphylococcus aureus* diuji untuk keberadaan 756-bp PCR produk dari gen koagulase. Denaturasi awal digunakan suhu 94°C selama 45 detik. Denaturasi pada suhu 94°C selama 20 menit, annealing 57°C selama 30 detik dan elongasi (perpanjangan) pada suhu 72°C selama 30 detik dipertahankan selama 30 siklus. Pada elongasi akhir digunakan suhu 72°C selama 3 menit dan reaksi berlangsung pada 4°C. Hasil produk amplifikasi ditampilkan berupa grafik dan nilai CT (*Cycle Threshold*).

4.7 Teknik Analisis Data

Teknik Analisa data yang digunakan adalah :

1. Identifikasi isolat bakteri swab ulkus diabetikum dilakukan secara konvensional dengan membandingkan karakter sampel dengan bakteri MRSA dengan uji sensitivitas antibiotik menggunakan *cefloxitin disc*.
2. Deteksi gen *Coa* bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA ditentukan dengan membandingkan hasil amplifikasi berupa nilai CT (*Cycle Threshold*).
3. Membandingkan jumlah sampel positif gen *Coa* berdasarkan jenis kelamin laki-laki dan perempuan dengan persentase yang dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah sampel positif Gen } Coa (\%) = \frac{\begin{array}{l} \text{Sampel positif gen } Coa \\ \text{jenis kelamin laki-laki} \\ \text{atau perempuan} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{Total keseluruhan} \\ \text{sampel positif gen} \\ Coa \end{array}} \times 100\%$$