

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *cross sectional*. Data diambil secara prospektif yaitu dengan mengambil data primer berupa sampel infeksi pasca operasi penderita di ruang bedah RSHS. Hasil dari isolat yang positif *S.aureus* dilakukan analisis PCR untuk dilihat gambaran strain-strain *S.aureus* dari luka infeksi pasca operasi penderita.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan, yaitu dari Juni sampai dengan November 2005, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung dan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung

3.3 Subyek dan Sampel Penelitian

Subyek penelitian ini adalah spesimen dari luka infeksi pascaoperasi penderita yang dirawat di RC II bedah dan RC II ortopaedi laki-laki kelas III RSHS pada periode waktu penelitian.

Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Infeksi luka pasca operasi adalah adanya tanda-tanda klinis berupa inflamasi, pus, dan keluaran (*discharge*) pada luka pasca operasi (Mims et al, 2004).
Kriteria inklusi luka operasi adalah semua jenis luka operasi menurut CDC.
2. Kriteria inklusi penderita adalah semua penderita yang dirawat di ruang bedah RSHS yang mengalami luka infeksi pasca operasi dengan jenis luka operasi apapun. Kriteria eksklusi penderita adalah semua penderita yang dirawat di ruang bedah RSHS yang tidak mengalami luka infeksi pasca operasi dengan jenis luka operasi apapun selama menjalani perawatan ruang bedah RSHS.

3.4 Bahan dan Alat-alat

Bahan dan alat-alat yang digunakan pada penelitian ini Luria Bertani (LB) *broth*, bahan-bahan dalam Kit *Wizard Genomic DNA Purification* dari Promega berupa EDTA 50 mM pH 8,0, Lisozim 10 mg/mL, Isopropanol, Etanol 70%, *nuclei lysis solution*, *protein precipitation solution*, *DNA rehydration solution*. Selain itu digunakan Master Mix PCR yang terdiri dari DNA genom sebagai templat, *reverse primer* dan *forward primer* gen *coa* dari DNA genom dengan menggunakan urutan basa nukleotida No akses X16457, dNTP, *Taq* DNA Polimerase dan buffer yang sesuai, Mg²⁺, ddH₂O.

Kontrol positif (dipakai DNA dari isolat murni *S.aureus* ATCC 6538), dan kontrol negatif (dipakai DNA dari isolat murni *S.epi lermidis* ATCC 12228). Selain

itu, dipakai pula larutan TAE 1x steril, ddH₂O steril, EtBr (Etidium Bromida) 10 mg/mL, *Loading Buffer*, Agarosa, DNA marker *ladder* 100 bp dan marker *PUC19/Hindf1*, tabung ependorf 1,5 mL, 200 uL dan sentrifuga. Dipakai pula alat PCR (*Thermalcycler*), ultraviolet transiluminator, unit elektroforesis dan Power Supply, inkubator dan inkubator *shaker*, vortex, kamera dan film, mikropipet, serta alat-alat dan bahan-bahan lain di Laboratorium Mikrobiologi.

3.5 Tata Kerja

3.5.1 Pengumpulan sampel

Sampel berupa apus luka operasi yang sesuai dengan kriteria inklusi dan diambil dengan cara mengapus luka operasi dengan menggunakan kapas lidi steril yang sudah dibasahi terlebih dahulu dengan NaCl steril. Kapas lidi yang telah diapaskan dimasukkan ke dalam *nutrient broth* dan segera dikirim ke laboratorium.

3.5.2 Identifikasi Bakteri dengan Cara Konvensional dan Pembuatan Kultur Semalam

Spesimen mula-mula dikultur dan diinkubasi suhu 37° C selama 18-24 jam pada lempeng agar darah. Selain itu, dilakukan identifikasi mikroskopik dengan menggunakan pewarnaan Gram. Lalu dilakukan identifikasi hasil kultur.

Selain itu, dilakukan uji katalase dengan meneteskan larutan H₂O₂ 3 % pada suspensi bakteri dari koloni tersangka di atas kaca obyek. Bila hasilnya positif,

dilanjutkan dengan uji koagulase *slide*. Uji koagulase pada kaca obyek, dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri menggunakan NaCl fisiologis pada kaca obyek. Suspensi bakteri dicampur dengan plasma sitrat, kemudian digoyang-goyang dan setelah 10 detik diperiksa ada tidaknya koagulase dengan melihat ada tidaknya gumpalan putih pada kaca obyek. Hasil positif ditandai dengan pembentukan gumpalan putih tersebut. Untuk kontrol dipakai suspensi bakteri tanpa diberi plasma darah. Apabila hasilnya negatif, dilanjutkan dengan uji koagulase cara tabung.

Uji koagulase pada tabung dilakukan dengan melabel tabung uji, lalu menambahkan secara aseptis 0,5 ml dari 1 : 4 dilusi plasma sitrat kelinci atau manusia dan 0,1 ml suspensi bakteri, lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Setiap jamnya selama 4 jam dilihat ada atau tidaknya penggumpalan. Bila dalam 4 jam tidak terjadi penggumpalan, inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam

Untuk langkah selanjutnya, dilakukan pemeriksaan hanya pada setiap isolat luka infeksi pascaoperasi penderita yang positif *S. aureus*, yaitu pembuatan kultur semalam dengan cara menanam isolat *S. aureus* secara steril pada tabung yang berisi 5 ml LB *broth*. Setelah itu, tutup tabung dan masukkan ke dalam inkubator *shaker* pada suhu 37°C selama 1 malam.

3.5.3. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification* Kit dari Promega. Mula-mula tambahkan 1 mL kultur semalam ke tabung 1,5 mL dan sentrifuga pada 13.000-16.000 xg selama 2 menit serta buang supernatan. Lalu, sel disuspensikan kembali dalam 480 uL EDTA 50 mM. Tambahkan 60 uL lisozim 10 mg/mL dengan pipet mikro dengan hati-hati untuk mencampur, pipet naik turun sampai tercampur. Sesudah itu, inkubasi pada 37°C selama 30-60 menit. Sentrifugasi selama 2 menit pada 13.000-16.000 xg dan buang supernatan. Tambahkan 150 uL *nuclei lysis solution*. Pipet naik turun dengan hati-hati sampai semua sel tercampur.

Inkubasi pada 80°C selama 5 menit untuk melisis sel, kemudian didinginkan di suhu ruang. Tambahkan 50 uL *protein precipitation solution*. Vortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik dan inkubasi selama 5 menit di es. Lalu sentrifugasi pada 13.000-16.000 xg selama 3 menit dan pindahkan supernatan yang mengandung DNA ke tabung 1,5 mL baru yang sudah mengandung 150 uL isopropanol suhu ruang. Hati-hati, jangan sampai ada DNA pellet terambil.

Campur dengan membolak-balikkan tabung sampai terlihat benang halus DNA dan sentrifugasi pada 13.000-16.000 xg selama 2 menit. Dengan hati-hati tuangkan supernatan dan keringkan tabung dengan membalikkan di atas tisu yang bersih. Tambahkan 150 uL etanol 70% suhu ruang dan membolak-balik tabung beberapa kali untuk mencuci DNA pellet. Sentrifugasi pada 13.000-16.000 xg selama 2 menit.

Buang etanol dengan hati-hati. Keringkan tabung pada konsentrator, atau balikkan tabung pada tisu bersih selama 10-15 menit. Tambahkan 25 μ L *DNA rehydration solution*. Lalu, Simpan DNA pada suhu 2-8 °C.

3.5.4 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan cara metode PCR Gen *coa* dari DNA Genom. Mesin PCR dihidupkan sekurang-kurangnya 15 menit sebelum digunakan. Master mix dibuat dengan melebihi 1 reaksi dari jumlah sampel yang akan di PCR. Sampel DNA divortex, lalu disentrifugasi sebentar sebelum digunakan.

Master mix dibagikan ke tabung PCR. Ditambahkan 10 μ L DNA templat, lalu dicampurkan dengan dipipet naik turun. Tabung disentrifugasi sebentar agar semua larutan turun. Tabung dimasukkan ke dalam mesin PCR. Kondisi reaksi PCR :

- 1) Denaturasi awal 94 °C selama 2 menit
- 2) Siklus amplifikasi (sebanyak 30 siklus) dimana setiap siklus terdiri dari:
 - Denaturasi : 94°C selama 1 menit
 - Annealing* : 42°C selama 1 menit
 - Elongasi : 72°C selama 1 menit
- 3) Post elongasi : 72 °C selama 10 menit
- 4) Penyimpanan : 4°C (untuk mempertahankan tetap dingin sebelum dilanjutkan ke tahap berikutnya)

3.5.5 Elektroforesis Agarosa DNA hasil PCR

Untuk mendeteksi produk PCR dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 2 % yang diwarnai dengan ethidium bromida. Hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan ultraviolet transiluminator dan dilakukan pemotretan untuk dokumentasi hasil.

3.6 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel frekuensi dan dinyatakan dalam prosentase.

3.7 Skema Alur Kerja

