

BAB IV

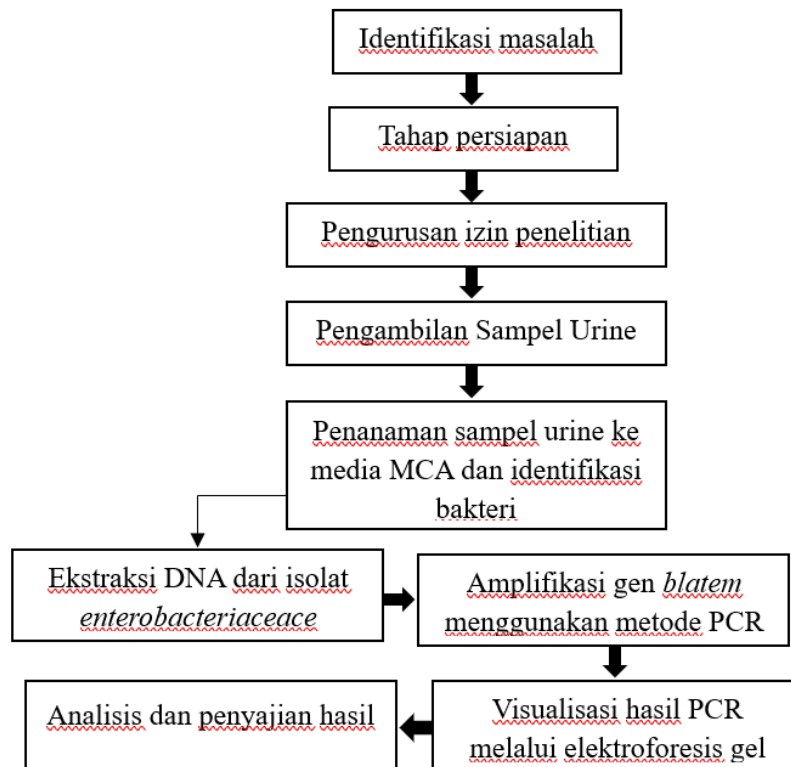
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan deskriptif observasional dengan pendekatan *cross-sectional*. Desain ini dipilih untuk menggambarkan keberadaan gen *blaTEM* pada isolat bakteri *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dari pasien Infeksi Saluran Kemih tanpa memberikan perlakuan atau intervensi terhadap sampel. Seluruh data diperoleh pada satu periode waktu tertentu melalui pemeriksaan laboratorik, meliputi kultur bakteri, serta deteksi gen *blaTEM* menggunakan metode PCR.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahapan sebagai berikut:



Gambar 2 Alur Penelitian

Keterangan Gambar:

Gambar ini menunjukkan tahapan pelaksanaan penelitian yang dimulai dari identifikasi masalah, tahap persiapan, dan pengurusan izin penelitian. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel urin, pemeriksaan kultur dan identifikasi bakteri. Isolat yang tumbuh kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi DNA, amplifikasi gen *blaTEM* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), serta visualisasi hasil PCR melalui elektroforesis gel agarosa. Tahap akhir penelitian meliputi analisis dan penyajian hasil penelitian.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar, yang merupakan tempat dilaksanakannya seluruh tahapan penelitian, meliputi kultur bakteri, serta pemeriksaan molekuler dengan metode PCR.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2025 hingga Maret 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Enterobacteriaceae* dari sampel urin pasien Infeksi Saluran Kemih.

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa sampel klinis urin pasien yang terkonfirmasi mengalami infeksi saluran kemih dan diperoleh dari RSUD Wangaya. Sampel urin tersebut dikultur pada media yang sesuai untuk memperoleh isolat bakteri

Enterobacteriaceae. Isolat yang diperoleh selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA, kemudian digunakan untuk pemeriksaan molekuler melalui deteksi gen *blaTEM* menggunakan metode PCR.

3. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode sampling purposif atau purposive sampling. Metode ini dipilih karena penelitian bertujuan untuk menganalisis karakteristik spesifik (gen *blaTEM*) pada populasi yang telah terdefinisi dengan jelas, yaitu seluruh isolat bakteri *Enterobacteriaceae* yang memenuhi kriteria inklusi selama periode penelitian. Adapun kriteria pada penelitian ini yaitu:

- a. Kriteria Inklusi Sampel Urine Sampel urine yang dapat dimasukkan dalam penelitian ini harus memenuhi semua kriteria berikut:
 1. Diagnosis Klinis ISK: Berasal dari pasien dengan diagnosis klinis Infeksi Saluran Kemih (ISK) yang ditetapkan oleh dokter berdasarkan gejala klinis (seperti disuria, urgensi, frekuensi berkemih meningkat, atau nyeri suprapubik) DAN didukung oleh hasil pemeriksaan urinalisis (misalnya, leukosit esterase positif dan/atau nitrit positif).
 2. Kultur Bakteri Positif: Menunjukkan pertumbuhan bakteri signifikan pada kultur, yaitu $\geq 10^5$ Colony Forming Units per mililiter (CFU/mL) pada media biakan, sesuai dengan standar diagnosis mikrobiologis ISK.
 3. Kesesuaian Waktu: Diambil selama periode waktu penelitian yang telah ditetapkan (misalnya, Februari – April 2026).
 4. Ketersediaan Data: Disertai dengan informasi identitas pasien yang lengkap dan dapat dilacak (kode sampel) untuk keperluan dokumentasi.

b. Kriteria Eksklusi Sampel Urine Sampel urine akan dikeluarkan dari penelitian jika memenuhi salah satu kriteria berikut:

1. Sampel Tidak Memadai: Volume urine tidak mencukupi untuk melakukan seluruh serangkaian pemeriksaan (kultur, dan ekstraksi DNA).
2. Kontaminasi: Sampel menunjukkan tanda-tanda kontaminasi selama pengambilan atau transportasi, seperti pertumbuhan lebih dari dua jenis mikroorganisme pada kultur *primer* yang mengindikasikan kontaminasi flora kulit atau non-patogen.
3. Patogen Non-*Enterobacteriaceae*: Bakteri yang tumbuh dominan merupakan patogen di luar famili *Enterobacteriaceae* (misalnya, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, atau *Pseudomonas aeruginosa*).

E. Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biosafety cabinet, inkubator, mikropipet beserta tip, tabung mikrocentrifuge dan microtube, thermal cycler (PCR), perangkat elektroforesis gel, UV transilluminator, autoclave, vortex, serta media kultur bakteri.

2. Bahan

Bahan yang digunakan terdiri atas sampel urin pasien, media *MacConkey Agar* dan, ose steril, kit ekstraksi DNA, *primer* spesifik gen *blaTEM*, pewarna DNA, master mix PCR, agarosa, buffer elektroforesis, dan aquadest steril.

3. Pre Analitik

Tahapan pre analitik mencakup seluruh proses sebelum sampel diproses di laboratorium. Langkah ini sangat penting untuk menjaga kualitas sampel agar hasil pemeriksaan tidak bias. Tahapannya meliputi:

a. Penerimaan Sampel Urin

Sampel urin yang datang ke laboratorium dicatat identitasnya meliputi kode pasien, tanggal, dan asal ruangan. Petugas memastikan bahwa sampel berasal dari pasien yang memenuhi kriteria penelitian.

b. Pemeriksaan Kondisi Sampel

Sampel diperiksa secara visual untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi, kebocoran, atau volume sampel yang terlalu sedikit untuk dilakukan pemeriksaan.

c. Penyimpanan Sementara

Bila sampel tidak bisa langsung diproses, sampel disimpan pada suhu 2–8°C untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan. Penyimpanan tidak boleh lebih dari 24 jam untuk menjaga keakuratan hasil.

d. Persiapan Alat dan Media

Semua alat yang akan digunakan (seperti ose, tabung, pipet, media kultur) disiapkan dalam kondisi steril dan sesuai SOP.

e. Penggunaan Teknik Aseptik

Semua proses penanganan sampel dilakukan dengan teknik aseptik untuk menghindari kontaminasi yang dapat memengaruhi hasil identifikasi bakteri.

4. Analitik

Tahap analitik merupakan proses inti penelitian karena pada tahap ini seluruh pemeriksaan laboratorium dilakukan untuk memperoleh data yang dibutuhkan.

Tahapan ini mencakup proses kultur bakteri, identifikasi *Enterobacteriaceae*, ekstraksi DNA, hingga pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen *blaTEM*. Penjelasan setiap tahapan adalah sebagai berikut:

a. Kultur dan Identifikasi Bakteri

Pada tahap ini, sampel urin diinokulasikan ke media *MacConkey Agar* menggunakan teknik aseptik untuk melihat keberadaan bakteri Gram negatif. Berikut tahapan nya:

1. Inokulasi sampel urin pada *MacConkey Agar*.
2. Inkubasi pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam.
3. Setelah inkubasi, koloni diamati berdasarkan warna, bentuk, dan karakteristik pertumbuhannya.
4. Setelah itu dilanjutkan dengan ekstraksi DNA dari koloni yang tumbuh.

b. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA genom murni sebagai *template* PCR, DNA harus memiliki kualitas baik agar amplifikasi PCR berjalan optimal. untuk tahapan nya sebagai berikut:

1. Koloni bakteri dimasukkan ke tabung mikrosentrifuge.
2. Proses ekstraksi dilakukan sesuai prosedur kit yang digunakan (misalnya lisis sel, pemisahan protein, dan pemurnian DNA).
3. DNA yang didapatkan disimpan pada suhu –20°C hingga siap digunakan untuk *template* PCR.

c. Amplifikasi Gen *blaTEM* Menggunakan PCR

1. Tahap ini bertujuan mendeteksi ada atau tidaknya gen *blaTEM* pada DNA isolat *Enterobacteriaceae*. Tahapan pengujian nya sebagai berikut:

2. PCR mix disiapkan yang terdiri dari *master mix*, *primer* spesifik *blaTEM*, template DNA, dan air bebas nuclease. *Primer* yang digunakan mengacu pada primer standar yang telah digunakan dalam penelitian Colom dkk., (2003) dengan sekuen sebagai berikut:

Primer forward blaTEM: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'

Primer reverse blaTEM: 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3'

Pasangan primer ini mengamplifikasi fragmen gen *blaTEM* dengan ukuran sekitar 850 bp (Colom dkk., 2003).

3. Tabung PCR dimasukkan ke dalam thermal cycler untuk melalui siklus PCR yang meliputi :
 - a. Denaturasi: dilakukan pada suhu 94–95°C selama 30–60 detik untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal
 - b. *Annealing*: dilakukan pada suhu 50–60°C selama 30–60 detik agar *primer* dapat menempel secara spesifik pada sekuens target gen *blaTEM*
 - c. Ekstensi: berlangsung pada suhu 72°C selama sekitar 60 detik, di mana enzim Taq DNA polymerase mensintesis untai DNA baru (Dallenne *et al.*, 2010).

Ketiga tahap tersebut diulang sebanyak 25–35 siklus dan diakhiri dengan *extension* akhir pada suhu 72°C selama 5–10 menit untuk memastikan amplifikasi DNA berlangsung optimal. Pengaturan suhu dan jumlah siklus yang tepat memungkinkan deteksi gen *blaTEM* secara sensitif dan spesifik (Green *et al.*, 2019; Widyawati *et al.*, 2024).

4. Setelah PCR selesai, hasil produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Adapun tahapan pembuatan gel agarosa sebagai berikut:

- a. Timbang bubuk agarose sebanyak 2,25 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan larutkan menggunakan 150 ml TAE buffer 1x pada hotplate hingga larutan berwarna bening.
 - b. Tambahkan staining gel sebanyak 6 μ l pada larutan agarose, homogenkan.
 - c. Tuangkan larutan agarose ke cetakan gel elektroforesis, pasang sisir untuk mencetak well pada gel agarose.
 - d. Tunggu hingga larutan memadat membentuk gel, kemudian cabut sisir.
 - e. Pindahkan gel agarose ke elektroforator dan tuangkan TAE buffer 1x hingga gel terendam.
 - f. Pipet DNA ladder sebanyak 10 μ l dan letakkan pada well pertama.
 - g. Pipet sampel sebanyak 10 μ l ke well selanjutnya. Setelah semua sampel selesai dipipet, setting alat elektroforator pada 77 volt, 200 ampere, dan 60 menit.
5. Gel diamati pada UV transilluminator.
 - a. Positif TEM: terlihat pita DNA pada ukuran target (sekitar 800–900 bp).
 - b. Negatif TEM: pita target tidak terlihat.

5. Post Analitik

Tahapan post analitik mencakup proses setelah pemeriksaan laboratorium selesai dilakukan. Tahap ini berfungsi untuk memastikan hasil yang diperoleh dapat dibaca, dicatat, dan dianalisis secara benar. Langkah-langkahnya meliputi:

a. Pencatatan Hasil

Semua hasil pemeriksaan dari proses kultur, dan PCR dicatat ke dalam lembar hasil atau database laboratorium. Dokumentasi biasanya disertai foto hasil PCR.

b. Verifikasi Data

Hasil yang telah dicatat diperiksa kembali untuk memastikan tidak ada kesalahan pencatatan atau interpretasi. Bila ditemukan hasil yang meragukan, pemeriksaan dapat diulang sesuai kebutuhan.

c. Pengolahan Data

Data yang sudah tervalidasi kemudian disusun dalam bentuk tabel atau rekapitulasi untuk mempermudah proses analisis. Pada tahap ini, isolat diklasifikasikan menjadi positif/negatif dan TEM-positif/negatif.

d. Penyajian Hasil

Hasil penelitian disusun dalam bentuk persentase atau tabel untuk menggambarkan pola resistensi dan keberadaan gen *blaTEM* pada isolat *Enterobacteriaceae*.

e. Penyimpanan dan Dokumentasi

Semua dokumen dan hasil pemeriksaan disimpan sebagai arsip penelitian. Sampel DNA atau isolat bakteri yang masih diperlukan dapat disimpan kembali sesuai kebutuhan laboratorium.

f. Pengelolaan Limbah

Limbah infeksius (supernatan ekstraksi DNA, mikrotip, tabung bekas, ose) dan limbah biologi (sisa reaksi PCR, gel agarosa, sampel DNA) ditempatkan dalam plastik *autoclave* dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum dibuang ke tempat sampah *biohazard*. Limbah umum (sarung tangan, masker, tisu) yang terkontaminasi disterilkan terlebih dahulu, sedangkan yang tidak terkontaminasi dapat langsung dibuang sebagai sampah domestik.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer dan sekunder.

- a. Data primer yaitu data yang diperoleh langsung dari hasil pemeriksaan laboratorium. Data tersebut meliputi:

- 1. Hasil kultur bakteri dari sampel urin untuk mengidentifikasi *Enterobacteriaceae*.
- 2. Hasil pemeriksaan molekuler berupa keberadaan atau ketiadaan gen *blaTEM* melalui teknik PCR.

Data ini merupakan hasil observasi dan analisis langsung dari isolat bakteri yang menjadi objek penelitian.

- b. Data Sekunder

Data sekunder merupakan data yang tidak diperoleh secara langsung dari proses pemeriksaan laboratorium, melainkan berasal dari sumber yang telah tersedia. Dalam penelitian ini, data sekunder berupa literatur ilmiah, jurnal penelitian, dan referensi terkait yang digunakan sebagai bahan pendukung untuk memperkuat analisis dan pembahasan hasil penelitian.

2. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan melalui serangkaian pemeriksaan laboratorium yang mengikuti prosedur standar operasional (SOP) pada setiap tahap. Teknik pengumpulan data mencakup:

- a. Melakukan kultur sampel urin pada media selektif untuk memperoleh isolat bakteri.

- b. Melakukan ekstraksi DNA, amplifikasi gen melalui PCR, serta analisis elektroforesis untuk mendeteksi gen *blaTEM*.

Setiap hasil pemeriksaan dicatat secara sistematis pada lembar kerja laboratorium untuk memastikan data yang terkumpul akurat dan dapat ditelusuri.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen yang digunakan untuk mengumpulkan data meliputi:

- a. Lembar kerja laboratorium, digunakan untuk mencatat hasil pemeriksaan kultur, identifikasi, dan PCR.
- b. Buku pencatatan hasil (logbook), digunakan untuk merekam setiap langkah pemeriksaan dan memastikan keterlacakan data.
- c. Dokumentasi foto, seperti foto hasil kultur sampel ke media dan elektroforesis PCR yang berfungsi sebagai bukti visual hasil penelitian.

Instrumen ini membantu memastikan bahwa seluruh data tersimpan dengan baik dan dapat diverifikasi.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik Pengolahan Data

Setelah semua data terkumpul, dilakukan proses pengolahan melalui tahapan berikut:

- a. Pencatatan: Seluruh hasil pemeriksaan dimasukkan ke dalam tabel rekapitulasi.
- b. Verifikasi: Data dicek ulang untuk memastikan tidak ada kesalahan pencatatan atau interpretasi.
- c. Klasifikasi: Isolat dikelompokkan berdasarkan hasil identifikasi dan PCR (positif atau negatif).

- d. Penyajian: Data kemudian disusun dalam bentuk tabel, diagram, agar lebih mudah dianalisis.

Proses ini bertujuan memastikan bahwa data yang dianalisis telah valid dan siap untuk ditafsirkan.

2. Analisa Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif, yaitu dengan menghitung jumlah dan persentase isolat *Enterobacteriaceae* yang menunjukkan:

- a. Positif atau negatif pada hasil identifikasi isolat *Enterobacteriaceae*.
- b. Positif atau negatif terhadap gen *blaTEM* berdasarkan pemeriksaan PCR.