

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini menggunakan 30 sampel urine penderita infeksi saluran kemih dengan kriteria inklusi tertentu. Pada tahap awal dilakukan inokulasi pada media *Sabouraud dextrose agar* (SDA) dan diinkubasi pada suhu ruang 37°C selama 4 hari untuk melihat adanya morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Jamur *Candida albicans* dapat tumbuh pada berbagai macam variasi pH, tetapi umumnya pertumbuhannya akan lebih baik pada pH antara 4,5-6,5. Jamur tumbuh dalam suhu optimum 27°C - 37°C. Morfologi koloni *Candida albicans* pada media *Sabouraud dextrose agar* (SDA) memiliki bentuk bulat dan besar dengan permukaan koloni sedikit cembung, licin, halus, dan kadang-kadang terdapat berlipat-lipat pada koloni yang telah tua dan berwarna putih kekuningan (Iqhasari, 2017). Secara mikroskopis sel jamur *Candida albicans* berbentuk bulat, bulat lonjong atau lonjong dengan memiliki ukuran 2-5µm x 3-6µm sampai 2-5µm x 5-28µm. *Candida albicans* terdiri dari pseudomiselium, pseudohifa yang membentuk blastospora pada bagian nodus-nodus dan khlamidospora pada bagian ujung-ujungnya (Rindi Astari, 2020). Pada pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis didapatkan hasil 9 sampel positif adanya pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan 21 sampel negatif tidak terdapat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Uji lanjutan untuk menentukan pemeriksaan secara biologi molekuler dengan tahap awal membuat suspensi biakan dari *Candida albicans*, uji ekstraksi, uji kemurnian DNA, optimasi dan pemeriksaan *Real Time* PCR dengan menunjukkan hasil berupa CT (*Cycle Threshold*).

Pada tahapan pembuatan suspensi sel, mula-mula jamur *Candida albicans* dari biakan jamur *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) menggunakan ose diambil satu koloni kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan menambahkan aquades steril sebanyak 300 $\mu$ l. Pada uji kemurniaan DNA menggunakan blanko yang terdapat reagen DNA Rehydration Solution dengan volume 2 $\mu$ l, selanjutnya tiap sampel di uji kemurniaan nya dengan volume 2 $\mu$ l. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan alat spektrofotometer nano drop dengan mengukur DNA murni hasil isolasi pada panjang gelombang 260 nm dimana pada panjang gelombang tersebut DNA menyerap cahaya paling kuat. Perhitungan kemurnian yang paling umum adalah dengan menentukan rasio absorbansi dari panjang gelombang 260 nm dibagi dengan absorbansi dari panjang 280 nm (Wasdili dan Gartinah, 2018). Pada uji kemurnian DNA hasil yang baik jika didapatkan konsentrasi DNA >5 ng/ul. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin baik kualitas kemurnian DNA.

Pemeriksaan *Real Time* PCR terdapat 3 tahapan yaitu denaturasi, pada proses denaturasi yaitu melepaskan rantai ganda DNA menjadi dua rantai tunggal DNA. Tahap kedua adalah Proses *annealing* atau pemasangan dua rantai primer (primer *forward* dan *reverse*) pada kedua rantai DNA. Primer mempunyai fungsi sebagai pancingan awal dalam pelipatgandaan segmen pada DNA. Tahap ketiga *Extention* pada proses *extention* terjadi adanya perpanjangan untai baru DNA. Sebelum pemeriksaan *Real Time* PCR dilakukan tahap optimasi. Optimasi untuk suhu *annealing* pada pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* merupakan salah satu parameter yang penting dalam spesifitas reaksi. Mengatur suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan adanya kemungkinan mengurangi hasil dari

produk PCR yang diinginkan. Pada suhu annealing yang terlalu rendah dapat mengakibatkan amplifikasi fragmen DNA yang non-spesifik (Amallea, 2020). Optimasi bertujuan untuk mencari variasi suhu dari *annealing*. Tahapan ini sangat berperan penting karena untuk mengetahui suhu optimum. Reaksi optimasi berlangsung dalam 3 tahap dalam setiap siklus. Tahap pertama adalah pra denaturasi pada suhu 95 selama 5 menit, denaturasi 95 selama 30 detik, 59,2 selama 30 detik, diikuti 40 siklus. Pada tahap optimasi penelitian ini didapatkan beberapa suhu annealing pada 60°C, 59,7°C, 59,2°C, 58,2°C, 57°C. Suhu optimal yang digunakan untuk melakukan running sampel pada suhu 59,7°C. Pada penelitian ini sesuai dengan penelitian menurut Amallea (2020) pada jurnal penelitian tersebut pada pemeriksaan *Candida albicans* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* didapatkan suhu annealing yang diperkirakan optimal untuk penelitian ini adalah 55°C, 59°C dan 62°C.

Pada pemeriksaan *Real Time* PCR dianggap sebagai teknik pemeriksaan yang sensitif dan akurat. Keuntungan yang didapatkan pada pemeriksaan ini adalah kemampuannya untuk menghasilkan data kuantitatif berupa CT (Busser *et al*, 2020). Pada beberapa tahun terakhir gen target yang sering ditemukan adalah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dari DNA banyak digunakan sebagai target untuk menganalisa keberagaman jamur, dan telah dipilih sebagai standart marker untuk barcode DNA jamur. Wilayah ITS adalah bagian dari kompleks gen RNA ribosom (rDNA) dan telah digunakan sebagai target dalam penelitian jamur *Candida sp*. Pada wilayah ITS merupakan wilayah non-coding terletak di antara ribosom 18S dan 28S. Wilayah ITS, yang terletak di antara DNA ribosom 18S dan 28S, dibagi lagi menjadi dua spacer, ITS1 dan ITS2, dipisahkan oleh wilayah konservasi 5.8S.

Wilayah ITS1 dan ITS2 adalah urutan yang sangat bervariasi yang telah digunakan untuk identifikasi jamur pada tingkat spesies (El-Naggar *et al*, 2010). Pada penelitian ini melakukan amplifikasi DNA *Candida albicans* dengan *Real Time* PCR dilakukan pada suhu 59,7°C diikuti dengan 40 siklus pada suhu 95°C selama 30 detik (denaturasi), 59,7°C selama 30 detik (*annealing*), dan 72°C selama 30 detik (*extension*). Pada penelitian Nabili *et al* (2013), amplifikasi DNA *Candida albicans* dengan *Real Time* PCR dilakukan sebanyak 45 siklus pada suhu 95°C selama 5 detik (denaturasi), 62°C selama 15 detik (*annealing*), dan 72°C selama 25 detik (*extension*). Pada penelitian El-Naggar *et al* (2010) melakukan amplifikasi pada suhu 95°C selama 10 menit diikuti 45 siklus PCR pada suhu 95°C selama 10 detik (denaturasi), pada suhu 65°C selama 5 detik (*annealing*) 72°C selama 10 detik (*extension*).

Pada hasil akhir dari pemeriksaan *Real Time* PCR yang ditunjukkan pada tabel 5.3 bahwa persentase hasil positif sejumlah 2 sampel dengan persentase 22,2% terdapat jamur *Candida albicans* dan hasil negatif sejumlah 7 sampel dengan persentase 77,8% tidak terdapat jamur *Candida albicans*. Adapun faktor-faktor tertentu yang dapat mengakibatkan keberadaan jamur *Candida albicans* pada urine penderita infeksi saluran kemih (ISK) seperti personal hygiene, diabetes mellitus, alat kontrasepsi dan penggunaan antiseptik (Rani *et al*, 2016). Hal ini juga di pernah dilakukan penelitian oleh Ortiz *et al* (1998) dengan melakukan penelitian menggunakan sampel urine sejumlah 73 sampel di rumah sakit honduras didapatkan hasil ditemukan jamur *Candida albicans* atau *dublinskiensis* sebesar 30%, *Candida glabrata* sebesar 28,8%, dan *Candida kefyr* sebesar 2,5% dan sisanya tidak terdapat jamur.