

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan untuk mengetahui deteksi profil protein bakteri *Salmonella typhi* pada penderita demam tifoid di Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah para penderita demam tifoid di Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik.

4.2.2 Sampel Penelitian

Spesimen yang digunakan adalah isolat bakteri penderita demam tifoid dari Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat penelitian

Tempat pengambilan data dilakukan di Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik. Tempat pemeriksaan spesimen dilakukan di *Institute of Tropical Disease (ITD)* – Universitas Airlangga.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2021 – Mei 2022

4.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah profil protein bakteri *Salmonella typhi* penderita demam tifoid.

4.5 Definisi Operasional Variabel

1. Profil protein bakteri *Salmonella typhi* adalah *Outer membran protein (OMP)* strain *Salmonella typhi* isolat penderita demam tifoid dari Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik yang diukur berat molekul menggunakan SDS- PAGE dan dinyatakan dalam kilo dalton (kDa)
2. Penderita demam tifoid adalah pasien positif demam tifoid berdasarkan rekam medis (pemeriksaan fisik dan serologi) kemudian dilakukan kultur darah dilanjutkan identifikasi *Salmonella typhi* menggunakan alat *Phoenix*, selanjutnya isolasi *Salmonella typhi*, pengukuran kadar protein dengan metode *Bradford* dan pengukuran berat molekul menggunakan SDS- PAGE

4.6 Pengumpulan Data

Pada penelitian ini dilakukan teknik pengumpulan data secara primer hasil pemeriksaan kultur pasien demam tifoid untuk diambil isolatnya.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat

Pada penelitian ini menggunakan beberapa peralatan yang dibagi berdasarkan pengambilan sampel, identifikasi bakteri *Salmonella typhi*, dan Pengukuran profil protein bakteri *Salmonella typhi*.

Pengambilan sampel darah menggunakan spuit, tourniquet, botol kultur, kapas steril, plester, dan alkohol swab. BD *Phoenix*TM 100, BD *Bactec*50, *Phoenix Inoculation Station*, *Phoenix Panel Caddy*, BD *Phoenixspec Nephelometer*, pipette 25 μ L dan 50 μ L, *pipette tips*, *vortex*, *Biosafety cabinet*, inkubator Memmert, pemanas Thermo Scientific, timbangan Ohaus Balance, autoclave

Hirayama, erlenmeyer, pHmeter. Tabung valcon, Pengukuran profil protein bakteri *Salmonella typhi* dengan alat elektroforesis, mikro pipet 20-200 ul, mikropipet 100-1000 ul, mikropipet 5 ul, mikropipet 10 ul, rak mikropipet, microtube, sentrifuge, *shaking incubator*, tabung reaksi, *Refrigerated centrifuge*, *Refrigerated ultracentrifuge*, Tabung konikel, *Effedendorf*.

4.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Salmonella typhi*. 30% *acrylamide*, 1,5 M Tris-Cl (pH 8,8), 1 M Tris-Cl (pH 6,8), SDS, β -mercaptoethanol, glycine, tris base, aquades steril, gliserol, Coomasie Brilliant Blue R250.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pemeriksaan Kultur Darah

- **Pengambilan Spesimen Kultur Darah**

Cara pengambilan spesiemen darah :

1. Pilih lokasi yang akan dilakukan sampling.
2. Pasang tourniquet kira-kira 5 cm di lokasi penusukan.
3. Lakukan desinfeksi dengan alkohol 70% dan biarkan mengering.
4. Desinfeksi lagi dengan *povinal iodine* 10% dan biarkan mengering (2 menit).
5. Lakukan penusukan di tempat yang telah ditentukan dan hisap darah sebanyak 8-10 ml untuk pasien, 1-3 ml untuk pediatrik dan 0,5–1 ml untuk pasien neonatus.
6. Cabut spuite dan tutup bekas tusukan dengan kapas atau kasa kering, lakukan penekanan beberapa saat.

7. Masukkan darah yang kita dapat ke dalam botol *Bactec*.
8. Goyangkan botol supaya darah dan cairan dalam botol *Bactec* homogen.
9. Pengambilan spesimen darah ini dilakukan dua kali pada sisi lengan yang berbeda (lengan kiri dan kanan) dengan jarak waktu 1 jam.
10. Kirim segera ke laboratorium < 2 jam. Jika tidak memungkinkan segera dikirim, simpan dalam suhu kamar < 24 jam.

- **Prosedur Penanaman Bakteri pada Media Biakan**

1. Spesimen darah dan cairan tubuh yang telah diambil langsung dimasukkan ke dalam botol *Bactec*.
2. Masukkan ke dalam alat *Bactec* 9050 dan inkubasi selama 1 – 5 x 24 jam. Jika tidak ada pertumbuhan, laporkan tidak ada pertumbuhan bakteri patogen. Jika ada pertumbuhan, Diambil cairan dari botol *Bactec* menggunakan spuit steril.
3. Lakukan pengecatan Gram dan penanaman pada media BAP dan MC agar menggunakan ose steril. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.8.2 Pewarnaan Gram

1. Dibuat sediaan pada kaca obyek, jangan terlalu tebal atau tipis. Fiksasi dengan api bunsen.
2. Genangi sediaan dengan Gentian Violet selama 1 menit. Bilas dengan air.
3. Genangi sediaan dengan Lugol Iodin selama 1 menit. Bilas dengan air.
4. Genangi dengan Aceton Alkohol selama 15 detik kemudian bilas dengan air.

5. Genangi sediaan dengan Safranin selama 30 detik. Kemudian bilas dengan air.
6. Keringkan dalam suhu kamar.

Prosedur Inokulasi pada Phoenix

1. Disiapkan inokulum.
2. Beri label tabung *Identification Broth* (ID), *Anti Susceptible Test* (AST) *broth* dan Panel.
3. Membuat suspensi kuman : diambil koloni dengan ose dari media pertumbuhan dan dimasukkan ke ID *broth*, vortex 5 detik.
4. Di diamkan sebentar untuk menghilangkan gelembung udara.
5. Mengukur kekeruhan dengan Nephelometer. Standar yang digunakan : 0,5–0,6 McFarland untuk Gram negatif dan 0.2-0.3 Mc Farland untuk Gram positif :
 - a .Jika kekeruhan yang dipakai 0,50 – 0,60 McFarland, transfer 25 μ L suspensi dari ID *broth* ke AST *broth*.
 - b. Jika kekeruhan yang dipakai 0,20 – 0,30 McFarland, transfer 50 μ L supensi dari ID *broth* ke AST *broth*.
6. Disiapkan AST *Broth*, Ditambahkan 1 tetes *Indicator Solution* Homogenkan AST *broth* dengan membolak balik tabung.
7. Disiapkan panel. Gunakan panel NMIC/ID (warna merah) untuk bakteri Gram negatif dan gunakan panel PMIC/ID (warna biru) untuk Gram positif.
8. Tempatkan panel pada *Inoculation Station*, ID *broth* sebelah kiri (untuk identifikasi spesies bakteri) dan AST *broth* sebelah kanan

(untuk uji sensitivitas antibiotik).

9. Tuangkan isi tabung ke dalam panel ID *broth* pada lubang sebelah kiri dan AST *broth* pada lubang kanan, tutup panel.
10. Tempatkan panel *Phoenix* ke panel *transport caddy* untuk dimasukkan ke mesin *Phoenix 100*.
11. Sistem identifikasi dari panel *Phoenix* menggunakan gula-gula biokimia konvensional dengan melihat terjadinya perubahan warna (reaksi kromogenik), reaksi fluoresen (fluorogenik) termasuk tes untuk oksidasi, fermentasi, degradasi dan hidrolisis berbagai substrat.

4.8.3 Perbanyakkan bakteri *Salmonella typhi*

- a. 9 Sampel dalam media ID dimasukkan ke dalam shaker incubator selama 15 menit dengan kecepatan 200 rpm.
- b. Sampel dikeluarkan dari shaker incubator dan di vortex
- c. Disiapkan media *Nutrien Broth* dan disterilkan dengan UV
- d. Dilakukan penanaman sampel pada media *Nutrient Broth* dengan masing – masing sampel 3 replikasi atau ulangan.
- e. Dilakukan inkubasi selama 1x 24 jam pada incubator

4.8.4 Isolasi *Outer Membrane Protein*

1. 9 sampel isolat ditanam dan dibiakkan di media *Nutrien Broth* digandakan menjadi 27 sampel
2. Kemudian masing – masing media *Nutrien Broth* dipindahkan ke tabung valcon ukuran 15 cc sebanyak 27 tabung falcon
3. Dilakukan sonifikasi setiap sampel pada valcon dengan kecepatan 35 KHz selama 30 detik istirahat 1 menit dilakukan sebanyak 15 siklus

4. Sentrifuge 1.400 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C dengan menggunakan sentrifuge dingin.
5. Supernatan diambil dipindah pada tub 1,5 cc sebanyak 27 tub
6. Dilakukan Sentrifuge kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30' (menit) pada suhu 4°C dan dilakukan pengulangan sebanyak 2x
7. Pelet diresuspensi dengan larutan PBS dan Triton X 2%
8. Inkubasi pada 37°C selama 20 menit
9. Sentrifuge pada 15.000 rpm selama 30 menit sebanyak 2 kali
10. Supernatan dibuang kemudian pelet diambil selanjutnya dilakukan resuspensi dengan PBS 100 ul.

4.8.5 Pembuatan Gel SDS-PAGE Dengan *Elektroforesis*

1. Persiapkan alat dengan melakukan pemasangan glass pada penjepit
2. Disiapkan Separating Gel 12% dengan bahan larutan stok akrilamid 30% sebanyak 3,33ml, Buffer Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8 sebanyak 2,5 ml, SDS 10% sebanyak 0,1 ml, Aquades 4,1 ml. lalu dimasukkan pada glass kaca yang sudah di jepit. Lalu tambahkan segera 100 ul APS 10%, TEMED 10 ul, aduk hingga tercampur merata.
3. Setelah Gel dimasukkan sampai tanda hijau kemudian ditambahkan aquadest Tunggu sampai membeku lalu aquadest dibuang.
4. Selanjutnya masukkan *Stacking* Gel 4% dengan bahan larutan stok akrilamid 30% sebanyak 1,2 ml, Buffer Tris-HCL 0,5 M, pH 8,8 sebanyak 0,5 ml, SDS 10% sebanyak 80 ul, Aquades 2,3 ml selanjutnya tambahkan segera 20 ul 10% APS dan 5 ul TEMED ke

glass kaca plate dan pasang sisir tunggu hingga membeku lalu dilepas sisir.

5. Setelah beku diambil glass dari penjepit dan pasang pada alat elektroforesis
6. Pada alat elektroforesis ditambahkan running buffer sampai tanda batas.
7. Sampel yang sudah dicampur dengan loading buffer dipanaskan di suhu 90-96 °C selama 5 menit
8. Sampel dibuat dengan perbandingan 1 : 1 dengan buffer elektroforesis
9. Dimasukkan 10µl marker pada kolom pertama selanjutnya dimasukkan 25µl sampel pada kolom berikutnya dengan urutan kode sampel A1, A2, A3, A4,A5,A6,A7,A8 dan A9.
10. Dilakukan Setting Running pada alat elektroforesis dengan ketentuan A : 0,4 V: 95 V t atau waktu selama 100 menit selanjutnya ditunggu hasilnya lalu dimatikan dan diambil Gel nya.
11. Kemudian dilakukan pewarnaan Gel dengan menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue*.

4.8.6 Pewarnaan Gel

Untuk tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel, dan larutan destaining untuk pencucian atau menghilangkan warna pada gel dan memperjelas band protein yang terbentuk. Gel direndam didalam 100 ml larutan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* sambil digoyang selama 30 menit, kemudian larutan pewarna dituang kembali ke wadahnya. Selanjutnya gel direndam dalam larutan destaining selama 1 jam. Dicuci dengan aquades lalu

diletakkan dalam wadah kemudian pita protein selanjutnya discan/di foto dengan kamera digital.

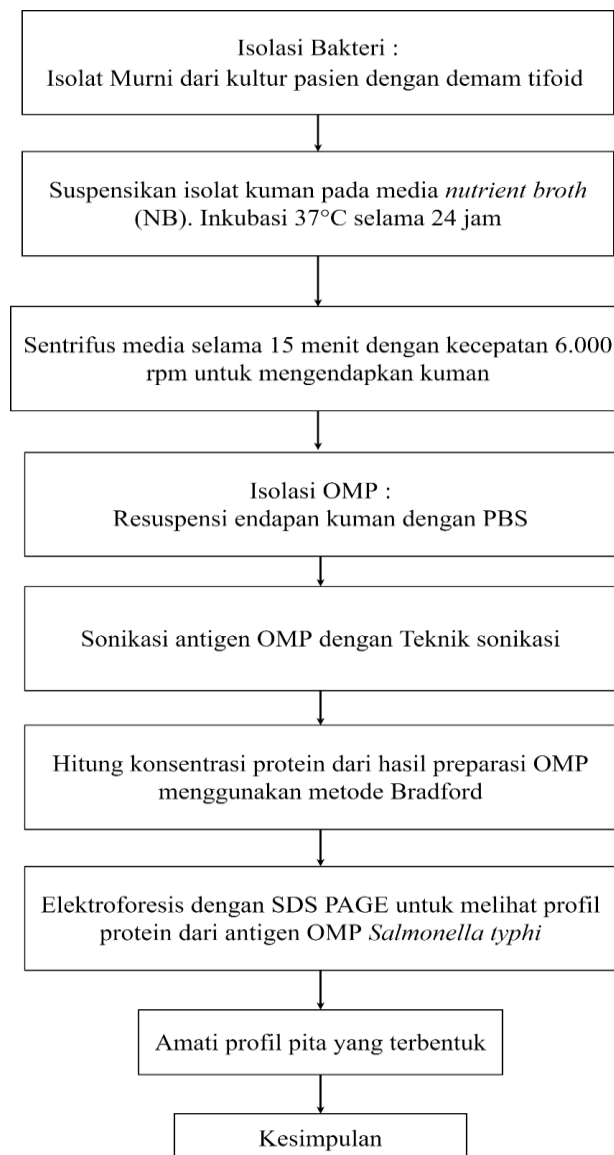
4.9 Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari Rf dan berat molekul yang didapat dari persamaan garis eksponential regression. Rf berada pada ordinat x dan BM berada pada ordinat y. Persamaan garis yang dapat digunakan untuk menghitung BM fraksi-fraksi OMP. Selanjutnya dilakukan pengolahan data dengan analisis data.

Tabel 4.1 menyajikan sebuah hasil dari pengolahan data yang di dapatkan.

NO.	Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan
1	0326 / A1	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
2	0193	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
3	0215	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
4	0218	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
5	0340 / A2	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
6	0195	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
7	0313	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
8	0318	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
9	0200 / A3	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
10	0207	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
11	0217	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
12	0602 / A4	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
13	0494	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
14	0431	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
15	0483 / A5	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
16	0449	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
17	0458 / A6	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
18	0423	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
19	0428	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
20	0665 / A7	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
21	0581	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
22	0584	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
23	0587	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
24	0624	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
25	0714 / A8	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>
26	0629	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
27	0630	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
28	0640	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
29	0654	Negatif (-) tidak terdapat isolat <i>Salmonella typhi</i>
30	0769 / A9	Positif (+) isolat <i>Salmonella typhi</i>

4.10 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional