

### III. METODE

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2015 di Laboratorium Biokimia MIPA Unila, UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Unila dan Laboratorium Mikrobiologi RSUDAM Provinsi Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikropipet (Socorex), UV transiluminator (Bio-Rad), aparatus elektroforesis horizontal (Bio-Rad), perangkat elektroforesis (Advance Mupid- ex), *laminar air flow* (Esco), *microwave*, centrifuga, inkubator, neraca analitik, oven, *hot plate*, *autoclave*, tabung mikrosentrifuga, mikrometer, jarum ose, pinset, lidi kapas steril, lampu spritus, rak tabung reaksi, tabung reaksi, cawan petri dan alat gelas lainnya

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah NaCl 0,85% steril, BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,175%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, reagen kovacks, *Mac conkey* (MC) agar, *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Simmon Citrat* (SC) agar miring, Urea agar miring, *Sulfur Indol Motility* (SIM), *Muller Hinton* (MH) agar, *Luria Bertani* (LB), disk antibiotik golongan aminoglikosida (Gentamisin 10 µg), golongan β laktam penisilin

(Ampisilin 10 µg), golongan β laktam Sefalosporin (Cefoperazone 75 µg), golongan β laktam Karbapenem (Meropenem 10 µg), golongan Sulfonamida (Kloramfenikol 30 µg) dan golongan Kuinolon (Siprofloksacin 5 µg). Kit Mini Plasmid Presto™ (Geneaid), bubuk agarosa (Invitrogen), buffer TBE 10X (Ultrapure), etidium bromida (*Syber Safe*), *loading buffer* (Invitrogen), Ladder DNA 1kb (Geneaid), gliserol 40%, akuades steril, akuabides.

Sampel yang digunakan adalah isolat *Pseudomonas aeruginosa* sebanyak 30 isolat yang diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi RSUDAM Provinsi Lampung. Sugiyono (2008) mengungkapkan bahwa ukuran sampel yang layak untuk penelitian adalah antara 30 hingga 500. Untuk penelitian eksperimen yang sederhana yang menggunakan kelompok eksperimen dan kontrol maka jumlah anggota sampel masing-masing 10 hingga 20 sampel.

### **C. Prosedur Penelitian**

Tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah:

#### **1. Pembuatan Media dan Bahan Pereaksi**

##### **a. MC agar**

Medium MC dibuat dengan cara ditimbang 52 g MC agar (Oxoid), dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut dengan sempurna. Larutan ini lalu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, dituangkan kedalam cawan petri steril, kemudian setelah membeku disimpan dalam refrigerator.

b. MH Agar

Medium MHA dibuat dengan cara ditimbang 40 g MH agar (Oxoid), dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut sempurna. Larutan ini lalu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, dituangkan kedalam cawan petri steril, kemudian setelah membeku disimpan dalam refrigerator.

c. TSIA

Medium TSIA dibuat dengan cara ditimbang 65 g TSIA (Oxoid), dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut dengan sempurna. Larutan ini dituangkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml, ditutup dengan kapas, kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. TSIA diletakkan pada posisi miring, kemudian setelah membeku disimpan dalam refrigerator.

d. Urea agar miring

Urea agar miring dibuat dengan cara :

Sebanyak 24,02 g Urea agar (Oxoid), dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut dengan sempurna (larutan A). Dilarutkan 400 g urea dalam 1000 ml akuades dan disterilkan dengan cara penyaringan (Larutan B). Kemudian dicampurkan secara aseptik 95 ml larutan A dan 5 ml larutan B. Campuran larutan ini dituangkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml, ditutup

dengan kapas, diletakkan pada posisi miring, kemudian setelah membeku disimpan dalam refrigerator.

e. SC agar miring

Medium SC dibuat dengan cara ditimbang 22,5 g SC agar (Oxoid), dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut. Larutan ini dituangkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5ml, ditutup dengan kapas, kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. SC agar diletakkan pada posisi miring, kemudian setelah membeku disimpan dalam refrigerator.

f. SIM semisolid

Sebanyak 30 g SIM (Oxoid) dilarutkan dengan 1000 ml akuades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut dengan sempurna. Larutan ini dituangkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 3ml, ditutup dengan kapas, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian setelah dingin disimpan dalam refrigerator.

g. Luria Bertani Cair

Komposisi media Luria bertani terdiri dari : *Bacto-tryptone/peptone* 10 g, ekstrak *bacto-yeast* 5 g, NaCl 10 g. Ditimbang masing-masing bahan tersebut, dilarutkan dengan 1000 ml akuades, diatur pHnya hingga 7,5 menggunakan NaOH, kemudian dipanaskan dengan *hot plate stirrer* hingga mendidih dan larut. Larutan ini dituangkan ke tabung reaksi masing-masing

sebanyak 5 ml dan 500  $\mu$ l kedalam tabung mikrocentrifuga, ditutup rapat, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah larutan dingin disimpan dalam refigetaror.

h. Pembuatan Luria Bertani Ampisilin

Dibuat larutan Ampisilin 1mg/ $\mu$ l dalam akuades steril pada vial antibiotik sebanyak 1000  $\mu$ l, kemudian diambil 100  $\mu$ l dipindahkan kedalam labu ukur dan ditambahkan hingga volume 100 ml. Dibuat dengan konsentrasi akhir 35-50 $\mu$ g/ml dengan cara diambil 200 $\mu$ l dimasukkan kedalam 5 ml media Luria bertani pada tabung reaksi dan 20 $\mu$ l kedalam 500  $\mu$ l Luria Bertani pada tabung mikrocentrifuga. Perlakuan ini dilakukan secara steril (Mubarika, 1989).

i. Pembuatan Pereaksi dan Bahan untuk Elektroforesis

Buffer TBE 10X : Sebanyak 108 gr Tris base, 55 g asam borat, 40 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) dilarutkan dalam akuades hingga volume tepat 1000 ml.

Buffer TBE 1x : Buffer TBE 1x dibuat dengan mencampurkan 50 ml buffer TBE 10x dan akuabides hingga volume tepat 500 ml.

Gel Agarosa 1% : Sebanyak 0,5 g bubuk agarosa dilarutkan dalam 50 ml buffer TBE 1x dalam Erlenmeyer, didihkan sampai larut dalam microwave selama  $\pm$  4 menit, dinginkan hingga 60°C, kemudian tambahkan 10  $\mu$ l *Syber Safe* dikocok hingga merata. Dituang kedalam *tray* yang sebelumnya telah dipasang sisir.

## 2. Pengambilan Sampel

Sampel penelitian ini berupa darah, nanah, sputum dan urine. Sampel tersebut dioles dengan lidi kapas steril, dimasukkan kedalam tabung, kemudian segera dibawa ke laboratorium.

## 3. Isolasi dan Identifikasi Isolat *Pseudomonas aeruginosa*

Proses identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan menurut (Frankel *et al.*, 1970 ; Sumarno, 2000). Dilakukan selama tiga hari, dengan tahapan sebagai berikut :

Hari pertama dilakukan penanaman pada cawan *MC* dan *Nutrient Agar(NA)* secara zig-zag tiga kuadran. Kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam.

Hari kedua dilakukan pembacaan hasil pertumbuhan pada cawan *NA* dan *MC* agar. Koloni yang memiliki ciri berukuran sedang, warna jernih/keruh, *smooth*, kadang kadang sedikit kehijauan, keping tepinya tidak rata, dan tidak menguraikan laktosa, diambil dan kemudian untuk ditanam secara gores ke media miring ,*TSI* agar, *SC* agar, dan urea agar. Selain itu koloni yang sama ditanam ke medium *SIM* dengan cara tusuk. Seluruh kultur tersebut kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

Hari ketiga lakukan pembacaan hasil pertumbuhan dan reaksi yang terjadi pada media *TSI*, *SC*, Urea dan *SIM*. Dari salah satu koloni terduga dilakukan dengan tes oksidase. Hasil reaksi yang terjadi dicocokkan dengan tabel biokimia untuk *Pseudomonas aeruginosa* . Hasil yang sesuai dilanjutkan pada uji resistensi.

#### 4. Uji Resistensi Isolat *Pseudomonas aeruginosa*

Dibuat suspensi bakteri dalam NaCl 0,85% steril, sehingga memiliki kekeruhan yang sama dengan standar *Mac Farlan*. Diambil dengan lidi kapas steril dan dioleskan pada MH agar hingga merata, kemudian didiamkan selama 10 menit. Ditempelkan disk Gentamisin 10 µg, Ampisilin 10 µg, Cefoperazone 75 µg, Meropenem 10 µg, Kloramfenikol 30 µg dan Siprofloxacina 5 µg dengan jarak masing-masing minimal 24 mm. Kemudian diinkubasi pada 37°C selama 16-18 jam. Diukur diameter zona hambatan yang berwarna jernih disekitar disk, diukur secara duplo kemudian dibandingkan dengan standar dari *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012)* (Sumarno, 2000 ; Pelczar *et al.*, 2008).

#### 5. Penyimpanan Isolat *Pseudomonas aeruginosa*

Isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang telah dilakukan uji resistensi selanjutnya disimpan dalam kultur stok gliserol. Penyimpanan isolat berfungsi agar isolasi plasmid dapat dilakukan secara bersamaan. Adapun penyimpanan dilakukan dengan cara :

Diambil koloni bakteri pada media MH agar yang telah diuji resistensinya sebanyak 1 mata ose, pindahkan ke media Luria bertani ampisilin pada tabung mikrocentrifuga, inkubasi pada 37°C selama 12 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan gliserol 40% sebanyak 500µl dan dihomogenkan, kemudian disimpan di *freezer*.

Ketika stok gliserol akan digunakan, dikeluarkan mikrocentrifuga dari *freezer* dan dipindahkan ke dalam ruangan hingga mencair, kemudian diambil suspensi bakteri

dan dimasukkan kedalam tabung Luria bertani ampisilin. Diinkubasi pada *shaker incubator* 37°C selama 16 jam. Suspensi bakteri siap dilakukan isolasi Plasmid.

#### **6. Isolasi Plasmid Isolat *Pseudomonas aeruginosa***

Isolasi plasmid dilakukan dengan prinsip lisis alkali (Sambrook and Russel, 2001) menggunakan Kit Presto™ Mini Plasmid. Adapun proses isolasinya adalah sebagai berikut :

##### a. Pemanenan

Dipindahkan 1,5 ml kultur Isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang ditumbuhkan pada medium Luria bertani ke tabung mikrocentrifuga. Dicentrifuge dengan kecepatan 14-16.000 xg selama 1 menit pada suhu kamar untuk membentuk pelet sel. Kemudian dibuang supernatan seluruhnya, gunakan ujung pipet kecil untuk memastikan supernatan telah habis.

##### b. Resuspensi Sel

Pelet sel ditambahkan 200µl Buffer PD1 yang mengandung RNase A. Ditambahkan 2 µl *TrueBlue Lisis Buffer* kemudian dihomogenkan dengan skaker secara perlahan.

##### c. Pemecahan Sel

Suspensi sel tersebut ditambahkan 200 µl Buffer PD2 kemudian campur dengan lembut dengan membalik tabung 10 kali. Didiamkan pada suhu kamar selama 2-5 menit untuk memastikan lisat telah homogen. Pencampuran sempurna ditandai jika suspensi berwarna biru.

##### d. Netralisasi

Suspensi tersebut ditambahkan 300 µl Buffer PD3 kemudian dihomogenkan

segera dengan membalik tabung 10 kali. Kemudian dicentrifuga pada 14-16.000 xg selama 3 menit di suhu kamar. Selama sentrifugasi, tempatkan kolom PDH dalam 2 ml tabung koleksi. Setelah menambahkan Buffer PD3, suspensi sel menjadi tidak berwarna.

e. Pengikatan DNA

Dipindahkan semua supernatan ke kolom PDH. Gunakan ujung pipet kecil untuk memastikan supernatan benar-benar dipindahkan tanpa mengganggu endapan. Centrifuga di 14-16.000 xg selama 30 detik pada suhu kamar lalu buang supernatannya. Diletakkan kembali kolom PDH ke tabung koleksi.

f. Pencucian

Ditambahkan 400  $\mu$ l Buffer W1 ke dalam Kolom PDH. Centrifuge pada 14-16.000 xg selama 30 detik. Dibuang secara perlahan, kemudian tempatkan kembali kolom PDH ke tabung koleksi. dilanjutkan dengan penambahan Buffer Wash.

g. Proses Elusi

Ditambahkan 50  $\mu$ l Buffer Elusi. Kemudian didiamkan setidaknya 2 menit untuk memungkinkan proses elusi untuk benar-benar diserap. Sentrifuga pada 14-16.000 xg selama 2 menit pada suhu kamar untuk mengelusi DNA murni.

## 7. Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil isolasi plasmid kemudian dielektroforesis dengan gel agarosa 1% (Sambrook and Russel, 2001; Meyers *et al.*, 1976). Gel diletakan di dalam aparatus elektroforesis dan direndam dengan larutan TBE 1x. Sampel hasil isolasi plasmid sebanyak 10  $\mu$ l dicampur dengan 2  $\mu$ l loading buffer diatas parafilm

dengan cara pipeting. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam sumur pada gel, demikian dengan ladder DNA 1 Kb pada sumur gel sebelah kiri. Dilakukan elektroforesis dengan menggunakan tegangan listrik sebesar 100 volt selama 45 menit. Pita DNA divisualisasi dengan UV transiluminator, kemudian hasil elektroforesis didokumentasikan.

#### **D. Analisis Hasil**

Data dalam penelitian ini akan dianalisis dengan :

##### 1. Analisis Univariat

Bertujuan mendeskripsikan karakteristik variabel yang diteliti, dalam bentuk jumlah dan persentase masing-masing kelompok (Hastono, 2007).

##### 2. Analisis Bivariat

###### a. Korelasi jenis sampel dengan profil plasmid.

Untuk melihat korelasi jenis sampel dengan profil plasmid yang kedua variabelnya merupakan data kategorik maka uji statistik yang digunakan adalah uji *Chi square* (Dahlan, 2001)

$$\text{Rumus Kai Kuadrat} : X^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

Keterangan :

- O : Frekuensi yang diamati
- E : Frekuensi yang diharapkan
- X : Nilai *Chi square*

b. Korelasi pola resistensi dengan profil plasmid.

Untuk melihat korelasi atau perbedaan mean dua kelompok mengandung plasmid dan tidak mengandung plasmid yang keduanya merupakan data kategorik dan numerik maka uji statistik menggunakan uji T independen (Hastono, 2007).

Rumus T test :

$$T = \frac{X_1 - X_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_2}\right)}}$$

$$Sp^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$df = n_1 + n_2 - 2$$

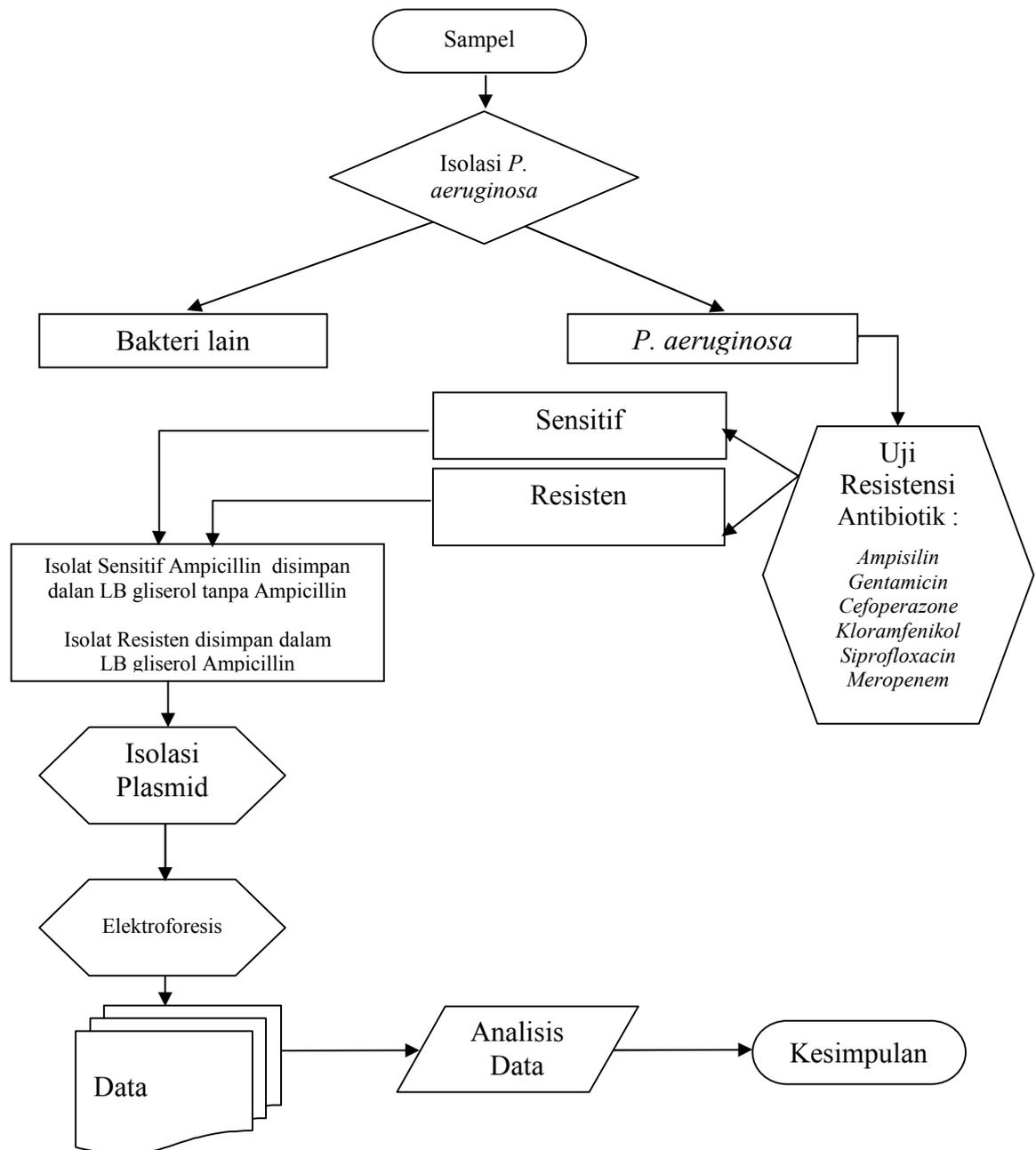
Keterangan :

$n_1$  atau  $n_2$  : Jumlah sampel kelompok 1 atau 2

$S_1$  atau  $S_2$  : Standar deviasi sampel kelompok 1 atau 2

### E. Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini dilakukan sesuai dengan diagram alir penelitian yang tersaji dalam Gambar 12.



**Gambar 12.** Diagram alir penelitian.