

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI *Staphylococcus aureus*
PADA ULKUS DIABETIKUM PASIEN DI RSUD PARIAMAN**



Oleh :

AZZURA OKTAVIANA AMRI

2010262007

**PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIS FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA**

PADANG

2024

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI *Staphylococcus aureus*
PADA ULKUS DIABETIKUM PASIEN DI RSUD PARIAMAN**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu persyaratan
Untuk memperoleh Gelar Sarjana Terapan Kesehatan (S.Tr.Kes)*

Oleh :

**AZZURA OKTAVIANA AMRI
2010262007**

**PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIS FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA**

PADANG

2024



Plagiarism Checker X - Report

Originality Assessment

21%

Overall Similarity

Date: Oct 7, 2024
Matches: 1422 / 6842 words
Sources: 53

Remarks: High similarity detected, please make the necessary changes to improve the writing.

Verify Report:
Scan this QR Code





a). Tempat/Tgl : Dumai, 17 Oktober 2002; b). Nama Orang Tua (Ayah) Syaiful Amri (Ibu) Elvia Saputri Dewi; c). Program Studi : Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis; d). Fakultas Ilmu Kesehatan; e). NIM : 2010262007; f). Tanggal Lulus : 24 Juli 2024; g). Predikat lulus: Pujian; h). IPK: 3,75; i). Lama Studi : 4 Tahun; j). Alamat : Kel.Teluk Binjai, Kec. Dumai Timur, Kota Dumai

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI *Staphylococcus aureus* PADA ULKUS DIABETIKUM PASIEN DI RSUD PARIAMAN
SKRIPSI

Oleh : Azzura Oktaviana Amri
Pembimbing : 1. Prof. Dr. Suryani, M.Si, 2. M.Diki Juliandi, M.Biotek

Abstrak

Pasien diabetes melitus rentan terhadap komplikasi seperti ulkus diabetikum. Infeksi pada ulkus diabetikum dapat disebabkan oleh berbagai patogen, termasuk *Staphylococcus aureus*, yang merupakan salah satu penyebab infeksi paling umum dalam luka ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* yang terdapat pada ulkus diabetikum menggunakan metode identifikasi molekuler (*Polymerase Chain Reaction*) dengan primer gen 16S rRNA. Sampel diambil dari pasien dengan ulkus diabetikum yang dirawat di RSUD Pariaman selama periode tertentu. Metode identifikasi molekuler meliputi penggunaan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk amplifikasi gen spesifik yang terkait dengan *Staphylococcus aureus*. Dari total empat sampel yang diidentifikasi, tiga sampel menunjukkan adanya pita DNA yang sesuai dengan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan primer 16S rRNA. Hal ini menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* teridentifikasi secara molekuler pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman. Satu sampel lainnya tidak menunjukkan adanya DNA yang sesuai dengan *Staphylococcus aureus*, kemungkinan keberadaan bakteri lain atau sedikitnya DNA bakteri tersebut, sehingga tidak tervisualisasikan oleh alat. Penelitian ini menekankan pentingnya identifikasi patogen dengan identifikasi molekuler untuk pengelolaan infeksi yang efektif dan pencegahan komplikasi pada pasien diabetes.

Kata kunci : *Staphylococcus aureus*, ulkus diabetikum, identifikasi molekuler, primer 16S rRna

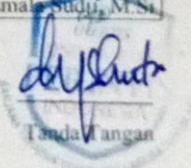
Skrripsi ini telah dipertahankan di depan sidang penguji dan dinyatakan LULUS pada tanggal 24 Juli 2024.

Abstrak ini telah disetujui oleh penguji :

Tanda Tangan	1.	2.	3.
Azzura Oktaviana Amri	Prof. Dr. Suryani, M.Si	M.Diki Juliandi, M.Biotek	Dr. rer. uaf Iktawati Resmah Sudi, M.Si

Mengetahui,

Ketua Program Studi : Dr. Apt. Dewi Yudiana Shinta, M.Si





a). Place/Date: Dumai, 17 October 2002; b). Name of Parents (Father) Syaiful Amri (Mother) Elvia Saputri Dewi; c). Study Program : Bachelor of Applied Medical Laboratory Technology; d). Faculty of Health Sciences; e). NIM : 2010262007; f). Graduation Date : July 24 2024; g). Pass predicate : praise; h). GPA: 3.75; i). Length of Study: 4 Years; j). Address : Kel.Teluk Binjai, Kec. Dumai Timur, Kota Dumai

Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* in Diabetic Ulcers of Patients at Pariaman Regional General Hospital

THESIS

By : Azzura Oktaviana Amri

Mentor : 1. Prof. Dr. Suryani, M.Si, 2. M.Diki Juliandi, M.Biotek

Abstrac

Patients with diabetes mellitus are susceptible to complications such as diabetic ulcers. Infections in diabetic ulcers can be caused by various pathogens, including *Staphylococcus aureus*, which is one of the most common causes of infection in these wounds. This study aims to identify *Staphylococcus aureus* bacteria present in diabetic ulcers using molecular identification methods (*Polymerase Chain Reaction*) with 16SrRNA gene primers. Samples were collected from patients with diabetic ulcers treated at RSUD Pariaman over a specific period. Molecular identification methods involved the use of PCR to amplify specific genes associated with *Staphylococcus aureus*. Out of the four samples identified, three showed visualization of DNA bands consistent with *Staphylococcus aureus* using the 16S rRNA primer. This indicates molecular identification of *Staphylococcus aureus* in diabetic ulcers of patients at RSUD Pariaman. One sample did not show visualization of DNA bands consistent with *Staphylococcus aureus*, suggesting the possible presence of other bacteria or a low amount of bacterial DNA that was not detectable by the equipment. This research emphasizes the importance of pathogen identification through rapid molecular testing for effective infection management and prevention of complications in diabetic patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, diabetic ulcers, molecular identification, 16SrRNA primer

This thesis has been defended in front of the examiner and declared **PASSED** on July 24, 2024.

This abstract has been approved by the examiner :

Signature	1.	2.	3.
Azzura Oktaviana Amri	Prof. Dr. Suryani, M.Si	M.Diki Juliandi, M.Biotek	Dr.rer.nat.Ikhwan Resmala Sudji, M.Si

Knowing,

Head of Study Program : Dr. Apt. Dewi Yudiana Shinta, M.Si



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Azzura Oktaviana Amri

Nim : 2010262007

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang ditulis dengan judul **“IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI *Staphylococcus aureus* PADA ULKUS DIABETIKUM PASIEN DI RSUD PARIAMAN”** adalah kerja/karya sendiri dan bukan merupakan duplikat dari hasil karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar maka status kelulusan menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, 09 Oktober 2024

Yang Menyatakan



Azzura Oktaviana Amri

BIODATA



Nama : Azzura Oktaviana Amri

Tempat, tanggal lahir : Dumai, 17 Oktober 2002

Agama : Islam

Jenis Kelamin : Perempuan

Alamat : Jl. Jenderal Sudirman Gg. Mulia No. 62, Kel. Teluk Binjai,
Kec. Dumai Timur, Kota Dumai, Provinsi Riau

Riwayat Pendidikan

1. TKIT Jamia'tul Muslimin Dumai
2. SDN 004 Teluk Binjai Dumai
3. SMP Nurul Ikhlas Padang Panjang
4. SMAS YKPP Bukit Datuk Dumai
5. Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis
UPERTIS (2020-2024)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pola penyakit di Indonesia telah mengalami perubahan signifikan dari penyakit infeksi dan kekurangan gizi menjadi penyakit degeneratif, termasuk diabetes melitus. Prevalensi diabetes melitus di Indonesia diperkirakan akan meningkat dua hingga tiga kali lipat pada tahun 2030, mencapai 21,3 juta orang dari sebelumnya 8,4 juta orang. Diabetes melitus dapat menyebabkan terjadinya luka diabetik karena gangguan pada saraf dan pembuluh darah, yang pada akhirnya dapat mengakibatkan infeksi pada pasien diabetes melitus tersebut. (Gehrke, Gai, and Gómez 2023)

Diabetes melitus adalah rangkaian gangguan metabolisme yang terjadi secara kronis karena produksi insulin yang tidak mencukupi oleh pankreas, menyebabkan kekurangan insulin baik secara absolut maupun relatif. Akibatnya, terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah (Ojo et al. 2023). Luka infeksi adalah kondisi di mana mikroorganisme menyerang dan berkembang biak dalam luka, memicu respons lokal atau sistemik pada tubuh. Kehadiran mikroorganisme ini dapat merusak jaringan sekitar dan menghambat proses penyembuhan luka. Penyebab umum infeksi adalah bakteri. Jika terjadi luka pada kulit, seperti akibat trauma, kecelakaan, operasi pembedahan, atau luka bakar, hal ini dapat memungkinkan bakteri masuk ke dalam tubuh dan menginfeksi luka.

Beberapa bakteri patogen yang sering terkait dengan luka infeksi meliputi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Streptococcus pyogenes*. Organisme-organisme ini memiliki

resistensi alami terhadap antibiotik dan antiseptik, sehingga dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama meski dengan nutrisi minimal, serta mampu tumbuh dan berkembang biak pada kulit yang mengalami trauma.

Ulkus diabetikum terjadi karena gangguan pada saraf dan arteri perifer yang mengakibatkan infeksi, ulserasi, dan kerusakan jaringan kulit pada kaki pasien diabetes melitus. Ulkus ini memberikan beban signifikan baik secara ekonomi, sosial, maupun medis, dan menjadi alasan utama untuk kunjungan pasien diabetes ke rumah sakit. Penderitaan dan penurunan kualitas hidup merupakan kontributor utama terhadap tingkat morbiditas yang dialami oleh penderita ulkus diabetikum. Diperkirakan sekitar 15% dari semua penderita diabetes berpotensi mengalami ulkus diabetikum. (Tong et al. 2022).

Untuk meningkatkan terapi atau pengobatan pasien yang terinfeksi bakteri, pemeriksaan diagnostik di laboratorium medis sangat penting. Pemeriksaan ini diperlukan untuk menegakkan diagnosis apakah seseorang terinfeksi agen bakteri patogen dan apakah infeksi tersebut termasuk dalam strain yang resistan terhadap antibiotik. Biasanya, laboratorium medis menggunakan teknik diagnostik konvensional seperti kultur dan mikroskopis untuk mendeteksi bakteri. Namun, terdapat teknik lain yang berkembang untuk uji diagnostik di laboratorium, yaitu metode molekuler. Metode molekuler merupakan aplikasi teknologi yang dapat dengan cepat dan akurat mendiagnosis patogen yang menginfeksi tubuh.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. (Auliantika and Wahyudi 2023). Identifikasi *S.*

aureus selama ini sebagian besar dilakukan dalam skala laboratorium dengan cara isolasi dan identifikasi mikroba secara konvensional menggunakan media selektif.

Beberapa keterbatasan dari metode ini adalah kondisi pertumbuhan bakteri pada saat sampel diperiksa, sampel kemungkinan hanya mengandung jumlah bakteri yang sedikit atau bahkan kultur negatif, hal ini dimungkinkan karena adanya residu antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan keterbatasan metode konvensional tersebut, maka teknologi molekular dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang lebih akurat dalam mengidentifikasi berbagai macam bakteri. (Aziz et al. 2020)

Berdasarkan penelitian (Unique 2016) dan (AKMAL 2023) Isolasi dan identifikasi Bakteri luka infeksi sekunder pada pasien diabetes mellitus di kota Jambi dengan metode konvensional sehingga memerlukan waktu yang lama untuk menyelesaikannya. Maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada Ulkus Diabetikum Pasien di RSUD Pariaman dengan menggunakan tes cepat molekular PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dengan Primer 16S rRNA.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang disebutkan diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu “Apakah ditemukan Bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman dengan Identifikasi Molekuler?”

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengidentifikasi adanya DNA bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman secara molekuler

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Menambah wawasan bagi peneliti mengenai identifikasi molekuler bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien.

1.4.2 Bagi Institusi

Dapat memberikan informasi serta masukan bagi mahasiswa di perpustakaan terkhusus pada bidang biologi molekuler

1.4.3 Bagi Tenaga Laboratorium

Sebagai referensi terhadap tenaga laboratorium mengenai identifikasi molekuler bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ulkus Diabetikum

2.1.1 Definisi

Ulkus diabetikum merupakan luka kronis yang sulit untuk sembuh karena gangguan neurologis (neuropati) dan masalah vaskular pada tungkai yang menyebabkan kerusakan jaringan. Gejala ulkus diabetikum meliputi penurunan sensasi nyeri, perubahan bentuk kaki, atrofi otot kaki, kalus, serta penurunan aliran darah ke jaringan. Kondisi ini membuat ulkus diabetikum rentan terhadap infeksi jika tidak segera diobati dan dirawat, yang dapat menyebar dan dalam kasus yang parah dapat mengarah pada amputasi. Kaki penderita diabetes cenderung rentan terhadap luka dan ulkus karena kurangnya sensasi nyeri, yang membuat penderita tidak menyadari atau mengabaikan adanya luka. (Nisak 2021)

Infeksi tersebut dapat menghambat proses penyembuhan, memperpanjang waktu penyembuhan, dan menyebabkan deformasi. Prevalensi ulkus diabetik mencapai sekitar 41% dari populasi, yang lebih umum terjadi pada orang tua. Sekitar 15% pasien diabetes mellitus mengalami ulkus diabetik, dan sekitar 14-20% dari mereka memerlukan amputasi. (Chairani et al. 2022)

2.1.2 Patofisiologi Ulkus Diabetes Melitus

Kaki diabetik terjadi diawali dengan adanya hiperglikemia yang menyebabkan gangguan saraf dan gangguan aliran darah. Perubahan ini menyebabkan perubahan distribusi tekanan pada telapak kaki, kerentanan terhadap infeksi meluas sampai ke jaringan sekitarnya. Faktor aliran darah yang kurang

membuat luka sulit untuk sembuh dan jika terjadi ulkus, infeksi akan mudah sekali terjadi dan meluas ke jaringan yang lebih dalam bahkan sampai ke tulang.

a. Neuropati Diabetik

Neuropati diabetik adalah komplikasi kronis yang paling sering ditemukan pada pasien diabetes melitus. Neuropati diabetik adalah gangguan metabolisme syaraf sebagai akibat dari hiperglikemia kronis. Angka kejadian neuropati ini meningkat bersamaan dengan lamanya menderita penyakit diabetes melitus dan bertambahnya usia penderita. Tipe neuropati terbagi atas 3 (tiga) yaitu :

1. Neuropati sensorik

Kondisi pada neuropati sensorik yang terjadi adalah kerusakan saraf sensoris pertama kali mengenai serabut akson yang paling panjang, yang menyebabkan distribusi stocking dan gloves. Kerusakan pada serabut saraf tipe A akan menyebabkan kelainan propiseptif, sensasi pada sentuhan ringan, tekanan, vibrasi dan persarafan motorik pada otot. Secara klinis akan timbul gejala seperti kejang dan kelemahan otot kaki. Serabut saraf tipe C berperan dalam analisis sensasi nyeri dan suhu. Kerusakan pada saraf ini akan menyebabkan kehilangan sensasi protektif. Ambang nyeri akan meningkat dan menyebabkan trauma berulang pada kaki.

2. Neuromatik motorik

Neuropati motorik terjadi karena demyelinisasi serabut saraf dan kerusakan motor end plate. Serabut saraf motorik bagian distal yang paling sering terkena dan menimbulkan atrofi dan otot-otot intrinsik kaki. Atrofi dari otot intraosseus menyebabkan kolaps dari arcus kaki. Metatarsal-

phalangeal joint kehilangan stabilitas saat melangkah. Hal ini menyebabkan gangguan distribusi tekanan kaki saat melangkah dan dapat menyebabkan kallus pada bagianbagian kaki dengan tekanan terbesar. Jaringan di bawah kalus akan mengalami iskemia dan nekrosis yang selanjutnya akan menyebabkan ulkus. Neuropati motorik menyebabkan kelainan anatomi kaki berupa claw toe, hammer toe, dan lesi pada nervus peroneus lateral yang menyebabkan foot drop. Neuropati motorik ini dapat diukur dengan menggunakan pressure mat atau platform untuk mengukur tekanan pada plantar kaki.

3. Neuropati otonom

Neuropati otonom menyebabkan keringat berkurang sehingga kaki menjadi kering. Kaki yang kering sangat berisiko untuk pecah dan terbentuk fisura pada kalus. Neuropati otonom juga menyebabkan gangguan pada saraf-saraf yang mengontrol distribusi arteri-vena sehingga menimbulkan arteriolar venular shunting. Hal ini menyebabkan distribusi darah ke kaki menurun sehingga terjadi iskemi pada kaki, keadaan ini mudah dikenali dengan terlihatnya distensi vena pada kaki.

b. Kelainan Vaskuler

Penyakit Arteri Perifer (PAP) adalah salah satu komplikasi makrovaskular dari diabetes melitus. Penyakit arteri perifer ini disebabkan karena dinding arteri banyak menumpuk plaque yang terdiri dari deposit platelet, sel-sel otot polos, lemak, kolesterol dan kalsium. PAP pada penderita diabetes berbeda dari yang bukan diabetes melitus. PAP pada pasien diabetes melitus terjadi lebih dini dan

cepat mengalami perburukan. Pembuluh darah yang sering terkena adalah arteri tibialis dan arteri peroneus serta percabangannya. Risiko untuk terjadinya kelainan vaskuler pada penderita diabetes adalah usia, lama menderita diabetes, genetik, merokok, hipertensi, dislipidemia, hiperglikemia, obesitas.

c. Infeksi

Infeksi dapat dibagi menjadi tiga yaitu superfisial dan lokal, selulitis dan osteomyelitis. Infeksi akut pada penderita yang belum mendapatkan antibiotik biasanya monomikrobial sedangkan pasien dengan ulkus kronis, gangren dan osteomyelitis bersifat polimikrobial. Kuman yang paling sering dijumpai pada infeksi ringan adalah *Staphylococcus Aereus* dan *streptococcal* serta *isolation of Methycillin-resstant Staphyalococcus aureus* (MRSA). Jika penderita sudah mendapat antibiotic sebelumnya atau pada ulkus kronis, biasanya dijumpai juga bakteri batang gram negatif (*Enterobactericeae*, *enterococcus*, dan *pseudomonas aeruginosa*).

2.2.4 Penatalaksanaan Ulkus Diabetikum

Tujuan utama dalam penatalaksanaan ulkus diabetikum adalah penutupan luka regulasi glukosa darah perlu dilakukan. Hal ini disebabkan fungsi leukosit terganggu pada pasien dengan hiperglikemia kronik. Perawatan ulkus diabetikum meliputi hal berikut :

a. Debridemet

Debridemet menjadi salah satu tindakan yang terpenting dalam perawatan luka. Debridemet adalah suatu tindakan untuk membuang jaringan nekrosis, kalus, dan jaringan fibrotik. Jaringan mati yang dibuang sekitar 2-3 mm dan tepi

luka ke jaringan sehat. Debridemet meningkatkan pengeluaran faktor pertumbuhan yang membantu proses penyembuhan luka. Ketika infeksi telah merusak fungsi kaki atau membahayakan jiwa pasien, amputasi diperlukan untuk memungkinkan kontrol infeksi, dan penutupan luka selanjutnya.

b. Perawatan luka

Penggunaan balutan yang efektif dan tepat menjadi bagian yang penting untuk memastikan penanganan ulkus diabetikum yang optimal. Keuntungan pendekatan ini yaitu mencegah dehidrasi jaringan dan kematian sel, akselerasi, angiogenesis, dan memungkinkan interaksi antara faktor pertumbuhan dengan sel target. Beberapa jenis balutan telah banyak digunakan pada perawatan luka serta didesain untuk mencegah infeksi pada ulkus (antibiotika), membantu Debridemet (enzim), dan mempercepat penyembuhan luka.

c. Terapi tekanan negatif dan terapi oksigen hiperbarik

Penggunaan terapi tekanan negatif berguna pada perawatan diabetik ulkus karena dapat mengurangi edema, membuang produk bakteri, dan mendekatkan tepi luka sehingga mempercepat penutupan luka. Terapi oksigen hiperbarik juga dapat dilakukan, hal ini dibuktikan dengan berkurangnya angka amputasi pada pasien dengan ulkus diabetikum. (Hapid 2020)

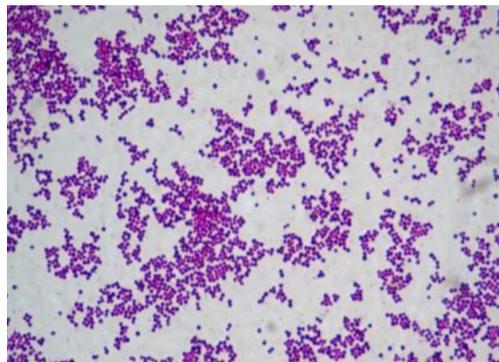
2.3 Bakteri

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas yang bersifat uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas dalam membran di dalam sitoplasmanya, sel bakteri berbentuk khas seperti bola, batang atau spiral yang umumnya bakteri

berdiameter 0,5-10 μm dan panjang antara 1,5- 2,5 μm dengan struktur luarannya berupa flagella, pili dan kapsul. (Civilization, TEMA 19, and Domenico 2021)

2.3.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari bahasa Yunani yaitu *staphyle* yang berarti sekelompok anggur. *Staphylococcus aureus* yang berlebih juga dapat menyebabkan keracunan makanan. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif yang menghasilkan pigmen kuning, bersifat aerob fakultatif, tidak menghasilkan spora dan tidak motil, umumnya tumbuh berpasangan maupun berkelompok, dengan diameter sekitar 0,5-1,5 μm . *Staphylococcus aureus* adalah flora normal, bakteri ini tetap menjadi patogen yang potensial yang sering menjadi penyebab bakteremia pada manusia. Bakteremia yang disebabkan *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai macam penyakit berbahaya dikarenakan bakteri ini memiliki faktor virulensi yang bervariasi. Antibiotik yang tepat dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*, tetapi resistensi bakteri ini terhadap beberapa antibiotik memaksa manusia untuk mencari alternatif antibiotik. (Amari 2023)



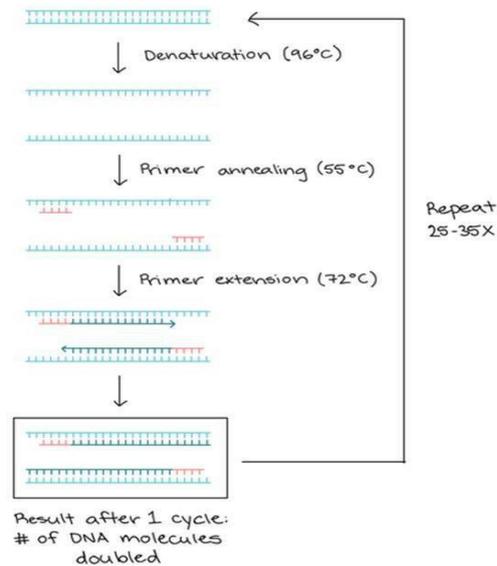
Gambar 1 Bakteri *Staphylococcus Aureus*
Sumber : (AKMAL 2023)

2.4 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode enzimatik yang digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara eksponensial dalam waktu relatif singkat untuk amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknologi PCR didasarkan pada urutan DNA yang diamplifikasi dengan DNA sintesis yang memiliki dua ujung rantai yang melengkapi dua primer oligonukleotida. Secara *in vitro* deteksi urutan DNA (template) diamplifikasi dalam aksi enzimatik. (Masykur 2019)

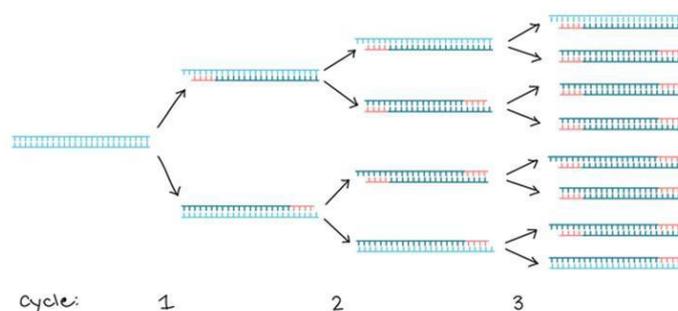
Secara umum, proses PCR dibagi menjadi tiga tahap.

- a. Tahap pertama adalah denaturasi, di mana cetakan DNA dipanaskan hingga 95°C selama 1-2 menit, sehingga rantai DNA ganda terpisah menjadi rantai tunggal.
- b. Tahap kedua adalah annealing, di mana primer menempel pada untai DNA yang telah terdenaturasi. Primer membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada sekuens yang komplementer dengan sekuens primer, yang terjadi pada suhu 40°C - 60°C.
- c. Tahap terakhir adalah perpanjangan, di mana primer yang menempel pada cetakan DNA diperpanjang dengan bantuan DNA polimerase sebagai katalis, dilakukan pada suhu 70°C - 75°C. Produk PCR kemudian dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. (Alhogbi et al. 2023)



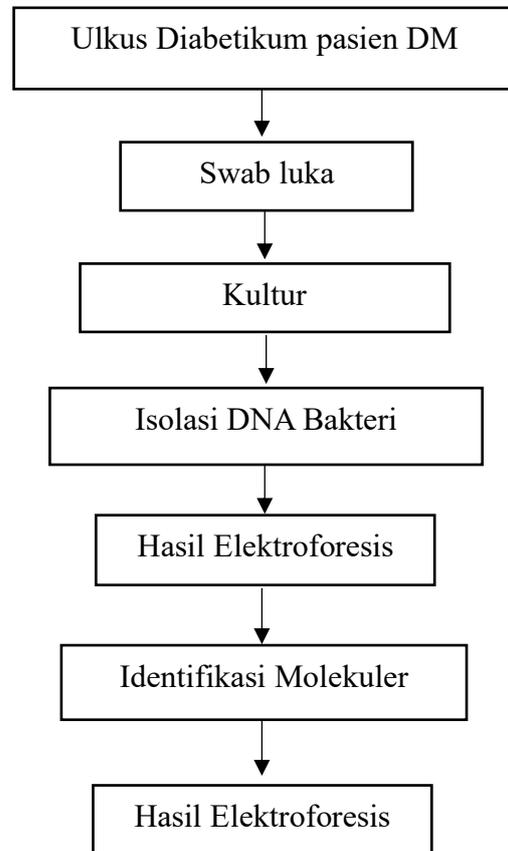
Gambar 2 Tahapan Proses PCR
 Sumber : (<https://shorturl.at/PYAe8>)

Siklus ini dilakukan sebanyak 25-35 kali dalam proses PCR, dengan durasi sekitar 2-4 jam tergantung pada panjang DNA yang hendak diperbanyak. Jika prosesnya berjalan dengan efisien, jumlah salinan area target bisa meningkat dari satu atau beberapa salinan menjadi milyaran. Dengan adanya banyak salinan primer ganda dan sejumlah besar molekul Taq polymerase dalam campuran reaksi, jumlah molekul DNA bisa berlipat ganda setiap siklus. Pola pertumbuhan eksponensial ini dapat dilihat pada gambar di bawah.



Gambar 3 DNA setelah Di PCR
 Sumber : (<https://shorturl.at/PYAe8>)

2.5 Kerangka Teori



2.6 Hipotesis

Ho : tidak adanya pita DNA bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman dengan metode identifikasi molekuler

Ha : adanya pita DNA bakteri *Staphylococcus aureus* pada ulkus diabetikum pasien di RSUD Pariaman dengan metode identifikasi molekuler

BAB V

PEMBAHASAN

Dalam penelitian yang sudah dilakukan, sampel diperoleh dari ruang rawat inap RSUD Pariaman, Sumatera Barat. Kemudian sampel tersebut menjalani proses identifikasi molekuler melibatkan tiga tahapan yaitu ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase chain reaction*), dan elektroforesis. Tujuan ekstraksi DNA adalah memisahkan DNA dari komponen sel lainnya sehingga diperoleh DNA yang murni. Ekstraksi DNA dilakukan dengan prinsip merusak dinding sel mikroorganisme agar DNA keluar dari dalam sel. Setelah ekstraksi DNA, dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase chain reaction*) yang bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu.

Proses PCR melibatkan tiga tahapan yaitu denaturasi (pada suhu 95°C), *annaelling* (pada suhu 55°C), dan *extention* (pada suhu 72°C). Proses PCR ini dilakukan sebanyak 35 siklus, dengan total durasi sekitar 120 menit. Setelah proses PCR, tahapan selanjutnya yaitu dilakukannya elektroforesis. Pada hasil elektroforesis, terlihat adanya fragmen DNA dengan ukuran sekitar 1.300 bp yang terpisah dan dibandingkan dengan marker DNA, yaitu fragmen DNA standar yang digunakan sebagai acuan dalam analisis. Elektroforesis DNA memberikan gambaran visual tentang kualitas dan ukuran fragmen DNA yang telah diamplifikasi, sehingga memungkinkan penilaian awal terhadap keberhasilan amplifikasi dan pemurnian sampel DNA. (Azyenela et al. 2023)

Berdasarkan dari hasil visualisasi amplifikasi gen 16S rRNA pada gambar 7. Menunjukkan terbentuknya pita DNA pada ukuran 900 bp pada sampel 1 dan 2. Hasil ini menunjukkan bahwa pita target DNA memiliki ukuran yang serupa, dengan perbedaan yang tampak pada ketebalan dan kejelasan masing-masing pita. Konsentrasi DNA dan primer mempengaruhi hasil produk pita DNA yang dihasilkan (Pertanian et al. 2011). Hasil elektroforesis yang memvisualisasikan produk PCR menunjukkan adanya pita-pita DNA dari ketiga lokus pada sampel yang berhasil diamplifikasi, meskipun tidak semua sampel menunjukkan ketebalan pita yang serupa. Variasi ini bisa disebabkan oleh perbedaan konsentrasi DNA dalam template yang digunakan untuk PCR, serta perbedaan dalam keberhasilan amplifikasi (perbanyak) konsentrasi DNA tersebut. (Pertwi, Mahardika, and Watiniasaih 2010)

Pada sampel 3 hasil menunjukkan bahwa pita target DNA memiliki ukuran berbeda dan sampel 4 tidak menunjukkan adanya pita target DNA. Menurut (Afif and Hilda Putri 2019) Kegagalan hasil PCR bisa disebabkan oleh kontaminasi dalam reaksi PCR, seperti protein atau RNA yang mungkin menutupi DNA target, menghalangi amplifikasi. Kontaminasi ini bisa muncul dari langkah isolasi DNA yang kurang baik atau pembuatan campuran PCR. Selain itu, kegagalan PCR juga bisa disebabkan oleh ketidakcocokan primer target DNA bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap 16S rRNA yang digunakan dalam proses amplifikasi.

Gagalnya amplifikasi juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang terjadi selama proses, seperti pada tahap pengambilan sampel, tahap ekstraksi DNA, tahap amplifikasi dengan PCR, dan tahap analisis menggunakan

elektroforesis. Faktor-faktor yang bisa mengakibatkan kegagalan amplifikasi DNA pada tahap ekstraksi meliputi: ketidaklulusan DNA saat penambahan elution buffer, lisis yang tidak optimal setelah inkubasi dengan buffer GB sehingga aktivitas proteinase K menurun (Amanda, Sari, and Apridamayanti 2019)

Penggunaan PCR sebagai alat deteksi diketahui memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, sehingga memungkinkan deteksi langsung keberadaan gen target dari genom bakteri tertentu. Deteksi dini kontaminasi bakteri patogen pada luka infeksi pada penderita ulkus diabetikum dapat dilakukan dengan cara yang lebih cepat menggunakan metode ini. (Aziz et al. 2020)

Data yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui desain *cross-sectional*, yaitu pada satu titik waktu tertentu, sehingga hasil penelitian hanya mencerminkan kondisi selama periode tersebut. Selain itu, peneliti menghadapi kesulitan dalam mencari bahan penelitian dan memiliki keterbatasan waktu untuk menemukan pasien diabetes melitus dengan luka terbuka.

