

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN CTX-M, TEM,
SHV PADA PUS PASIEN ULKUS DIABETIKUM DI
RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG**

DRAFT PROPOSAL



Oleh :

DIAN NURJANAH
NIM : 1904014

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
2023**

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan penyakit yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah baik disebabkan oleh kerusakan pankreas maupun resistensi insulin ataupun keduanya yang ditandai oleh hiperglikemia yang berhubungan dengan kelainan karbohidrat, lemak, metabolisme protein dan komplikasi kronis termasuk mikrovaskular dan gangguan neuropatik (Yunir, 2006). Gangguan pada neuropatik meningkatkan morbiditas, terutama melalui perannya dalam patogenesis ulkus diabetik (McPhee *et al.*, 2010).

Merujuk pada prevalensi nasional, Sumatra Barat memiliki prevalensi total diabetes sebanyak 1,3%, dimana Sumatra Barat berada di urutan 14 dari 33 provinsi yang ada di Indonesia (Kemenkes RI, 2013). Salah satu komplikasi diabetes melitus adalah ulkus. Ulkus diabetikum merupakan manifestasi dari infeksi, dan atau destruksi jaringan ikat bagian dalam yang berhubungan dengan neouropati dan penyakit vaskuler perifer pada tungkai bawah (Decroli, 2008).

Pengobatan ulkus dengan infeksi bakteri kultur positif dianjurkan dengan pemberian antibiotik. Antibiotik memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri (Lipsky *et al.*, 2012). Ada beberapa bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik, salah satunya bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) (Bush dan Jacoby, 2010). *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) adalah kelompok enzim yang memecah antibiotika golongan penisilin dan sefalosporin sehingga bakteri resisten terhadap jenis antibiotika ini (Shaikh *et al.*, 2015). Bakteri yang dapat menghasilkan enzim *Extended Spectrum β Lactamase*

(ESBL) umumnya bakteri gram negatif, seperti *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Eschericia coli*, *Acinetobacter*, *Burkhlorderia*, *Citobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, dan *Seratia spp* (Mardia, 2015).

Resistensi terhadap golongan sefalosporin dapat disebabkan oleh kemampuan bakteri mengeluarkan enzim beta-laktamase dimana enzim ini dikode oleh gen R (resisten) pada plasmid bakteri. Sehingga penyebaran resistensi sangat mudah terjadi antar strain bahkan antar spesies. Keadaan ini membuat pilihan antibiotika untuk melawan organisme yang memproduksi *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) sangat terbatas (Kaur *et al.*, 2013).

Gen yang pertama kali dimediasi beta-laktamase adalah TEM, gen ini dapat menyebar ke berbagai spesies bakteri melalui konjugasi. Kemudian gen lain juga muncul seperti SHV dan CTX-M yang dapat meningkat menjadi multi resistant. Deteksi gen resisten CTX-M, TEM, dan SHV bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen ini, dimana masing-masing berperan dalam resistensi terhadap antibiotika (Kaur *et al.*, 2013).

Identifikasi gen penyandi *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri *proteus mirabilis* penyebab infeksi kaki diabetik telah dilakukan sebelumnya pada penelitian Fattah *et al* (2020) dengan menggunakan gen TEM, SHV, CTX-M, OXA, dan DHA menunjukkan bahwa 80% isolat *Proteus mirabilis* mengandung blaDHA, 60% memiliki blaTEM, 53,3% memiliki blaOXA, dan 26,7% memiliki blaCTX-M, sedangkan tidak ada isolat yang mengandung blaSHV. Pada penelitian Herdissa (2020) tentang identifikasi bakteri *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus ulkus diabetikum menggunakan gen 16s rRNA didapatkan jenis bakteri pada kelompok bakteri gram positif *Corynebacterium*

striatum dan pada kelompok bakteri gram negatif *Proteus mirabilis* dan *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*. Pada penelitian lain didapatkan jenis bakteri yang banyak ditemukan dalam pus ulkus diabetikum berturut-turut adalah *Klebsiella pneumonia* (40%), *Staphylococcus epidermidis* (60%), *Proteus vulgaris* (10%), *Proteus mirabilis* (10%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%) dan *Staphylococcus aureus* (10%). Identifikasi bakteri ini dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji Biokimia (Novelni *et al.*, 2019).

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi gen penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) terdiri dari CTX-M, TEM dan SHV dengan metode molekuler menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang berjudul “Isolasi Dan Identifikasi Gen CTX-M, TEM, SHV Pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang”.

1.2. Rumusan Masalah Penelitian

1. Apakah pada pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang terdapat bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL)?
2. Apa gen penyandi *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri yang menyebabkan ulkus pada pasien diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang?
3. Apa spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah pada pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang terdapat bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL).
2. Untuk mengetahui gen penyandi *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri yang menyebabkan ulkus pada pasien diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
3. Untuk mengetahui spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan Informasi mengenai apakah pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang teridentifikasi bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL).
2. Mendapatkan informasi mengenai gen apa yang menjadi penyebab *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri yang menyebabkan ulkus pada pasien diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
3. Mendapatkan Informasi mengenai apa spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang.

1.5. Hipotesis

1. H_0 : Pus pada pasien ulkus diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang tidak teridentifikasi bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL).

H₁ : Pus pada pasien ulkus diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang teridentifikasi bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL).

2. H₀ : Gen yang menjadi penyebab *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri yang menyebabkan ulkus pada pasien diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang tidak dapat diidentifikasi.

H₁ : Gen yang menjadi penyebab *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) bakteri yang menyebabkan ulkus pada pasien diabetikum yang di rawat inap di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang dapat diidentifikasi.

3. H₀ : Spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus pasien ulkus diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang tidak dapat diidentifikasi.

H₁ : Spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) pada pus pasien ulkus diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang dapat diidentifikasi.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Definisi

Diabetes melitus adalah kelainan sistem insulin karena berlebihnya kadar glukosa di dalam darah. Dikatakan mengidap diabetes apabila kadar gula dalam darahnya melebihi 7,0 mmol/L (berpuasa) atau 11,1 mmol/L (tidak berpuasa). Diabetes melitus merupakan kondisi kronis yang ditandai dengan defisiensi atau resistensi insulin relative atau absolut, dan ditandai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak (Masriadi, 2018).

2.1.2. Epidemiologi

Setiap tahunnya insiden dan prevalensi diabetes melitus terus mengalami peningkatan, pada tahun 2013 lebih dari 392 juta orang di dunia menderita diabetes melitus selanjutnya diperkirakan akan terjadi peningkatan pada tahun 2035 menjadi 592 juta penderita di seluruh dunia. Indonesia menempati urutan ke-4 dengan jumlah penderita 8,4 juta terbesar di dunia setelah India, Cina dan Amerika Serikat (Taufiqqurohman, 2015). Studi WHO dan PERKENI menunjukkan hasil yang serupa yaitu adanya peningkatan angka insiden dan prevalensi diabetes melitus Tipe 2, baik di dunia maupun di Indonesia. Menurut WHO (2014), Indonesia memiliki jumlah penderita diabetes melitus sebanyak 8,5 juta dari total penduduk, dan diprediksi akan terus meningkat. Hal ini juga didukung dengan pernyataan PERKENI (2011) yang menyatakan bahwa akan terjadi peningkatan jumlah penyandang diabetes melitus sebanyak 2-3 kali lipat pada tahun 2030. Tingginya peningkatan prevalensi penyandang diabetes melitus

Tipe 2 di Indonesia dari tahun ke tahun disebabkan oleh gaya hidup yang tidak sehat, pola makan yang tidak seimbang dan kurangnya aktivitas fisik atau olahraga. Jenis diabetes yang paling banyak dijumpai adalah diabetes melitus tipe 2 yang biasanya terjadi pada usia 45 tahun, tetapi bisa pula timbul pada usia 20 tahun (Putri dan Isfandari, 2013).

2.2. Ulkus Diabetikum

2.2.1. Definisi

Ulkus diabetikum adalah salah satu bentuk komplikasi kronik Diabetes Melitus berupa luka terbuka pada permukaan kulit yang dapat disertai adanya kematian jaringan setempat. Ulkus diabetikum terjadi karena adanya komplikasi makroangiopati sehingga terjadi insufisiensi vaskuler dan neuropati, yang lebih lanjut terdapat luka pada penderita yang sering tidak dirasakan, dan dapat berkembang menjadi infeksi oleh bakteri aerob maupun anaerob (Astuti, 2008).

Ulkus diabetikum merupakan komplikasi diabetes yang berkaitan dengan morbiditas, yang disebabkan oleh makrovaskuler (kerusakan pembuluh darah besar) dan mikrovaskuler (kerusakan pembuluh darah kecil) (A. Yuda Handaya, 2016).

2.2.2. Klasifikasi

Menurut Wagner, ulkus kaki pada penderita diabetes melitus dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

- a. Tingkat 0, yaitu tidak ada luka terbuka di kaki.
- b. Tingkat 1, yaitu dijumpai ulkus superfisial (sebagian atau seluruh lapisan kulit).

- c. Tingkat 2, yaitu ulkus dijumpai pada ligamen, tendon, pembungkus sendi, atau fascia dalam (deep fascia) tanpa abses atau osteomielitis.
- d. Tingkat 3 yaitu luka lebih dalam, seringkali dikaitkan dengan peradangan jaringan di sekitarnya. Tidak ada infeksi pada tulang dan pembentukan abses.
- e. Tingkat 4, yaitu gangren yang terlokasi, seperti pada jari kaki, bagian depan kaki atau tumit.
- f. Tingkat 5, yaitu gangguan pada seluruh kaki (A. Yuda Handaya, 2016).



Gambar 1. Klasifikasi Kaki Diabetik Menurut Wagner-Meggitt (Edmonds, 2018)

2.2.3. Etiologi

Ulkus diabetikum pada pasien diabetes dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti neuropati perifer, penyakit arteri perifer, kelainan bentuk kaki, trauma kaki dan gangguan resistensi terhadap infeksi (Noor *et al.*, 2015).

a. Neuropati Perifer

Neuropati adalah penyakit yang dapat mempengaruhi saraf dan menyebabkan gangguan sensasi, gerakan dan aspek kesehatan lainnya. Neuropati disebabkan oleh kelainan metabolik karena hiperglikemia. Gangguan sistem saraf motorik, sensorik dan otonom merupakan akibat neuropati. Neuropati motorik menyebabkan perubahan pada kemampuan tubuh untuk mengatur gerakan

sehingga terjadi deformitas kaki, kaki charcot, jari kaki martil, cakar dan memicu atrofi otot kaki yang mengakibatkan osteomilitis.

Neuropati sensorik dapat menyebabkan gangguan pada saraf sensorik, kerusakan dan cedera berulang yang mengakibatkan gangguan integritas kulit sehingga menjadi pintu masuk invasi mikroba. Hal tersebut menjadi penyebab terjadinya luka yang tidak sembuh dan membentuk ulkus kronis. Kehilangan sensasi atau rasa kebas sering kali menyebabkan trauma atau lesi yang terjadi tidak di ketahui. Neuropati otonom dapat menyebabkan penurunan dari fungsi kelenjar keringat dan sebaseus di kaki sehingga kulit kaki menjadi kering serta mudah terbentuk fisura. Kaki kehilangan kemampuan pelembab alami dan kulit menjadi lebih rentan rusak dan berkembangnya infeksi (Noor *et al.*, 2015).

b. *Peripheral Artery Disease (PAD)*

Penyakit arteri perifer atau *Peripheral Artery Disease (PAD)* adalah penyakit pada ekstremitas bawah karena terjadinya penyumbatan arteri yang disebabkan oleh atherosklerosis. Perkembangannya mengalami proses yang bertahap di mana arteri menjadi tersumbat, menyempit atau melemah, peradangan yang berkepanjangan dalam mikrosirkulas dan menyebabkan penebalan kapiler sehingga membatasi elastisitas kapiler yang menyebabkan iskemia.

Penyumbatan pada arteri besar dan menengah, seperti pembuluh femoropopliteal dan aortoiliaka menyebabkan iskemia akut atau kronis pada otot. Perfusi arteri yang menurun mengakibatkan aliran darah yang tidak lancar sehingga dapat menyebabkan pasien berisiko mengalami ulkus, penyembuhan luka yang buruk dan ulkus berkembang menjadi gangren (Noor *et al.*, 2015).

c. Kelainan Bentuk Kaki

Kelainan bentuk kaki disebabkan oleh neuropati diabetes sehingga mengakibatkan peningkatan tekanan kulit saat berjalan (Bandyk, 2018). Kelainan bentuk kaki seperti hallux valgus, jari kaki palu atau jari kaki cakar, jari kaki martil dan kaki charcot. Kaki charcot sering muncul tanpa gejala dan sering berkembang menjadi kelainan bentuk kaki yang serius dan tidak dapat disembuhkan yang dapat menyebabkan kejadian ulserasi. Pasien dengan kelainan bentuk kaki juga harus memperhatikan alas kaki yang digunakan dan disesuaikan dengan bentuk kaki untuk mencegah terjadinya ulserasi (Cuestavargas, 2019).

d. Imunopati

Imunopati terlibat dalam kerentanan yang ada pada pasien diabetes terhadap infeksi serta potensi untuk meningkatkan respons normal inflamasi. Infeksi pada luka dapat mudah terjadi karena sistem kekebalan atau imunitas pada pasien DM mengalami gangguan (*compromise*). Gangguan pertahanan tubuh yang terjadi akibat dari hiperglikemia yaitu kerusakan fungsi leukosit dan perubahan morfologi makrofag. Selain menurunkan fungsi dari sel-sel polimorfonuklear, gula darah yang tinggi merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan bakteri. Penurunan kemotaksis faktor pertumbuhan dan sitokin, ditambah dengan kelebihan metaloproteinase, menghambat penyembuhan luka normal dengan menciptakan keadaan inflamasi yang berkepanjangan (Pitocco *et al.*, 2019).

e. Trauma

Tidak disadarinya trauma yang terjadi dapat disebabkan oleh penurunan sensasi nyeri pada kaki. Trauma yang kecil atau trauma yang berulang, seperti pemakaian alas kaki yang sempit, terbentur benda keras, atau pecah-pecah pada

daerah tumit disertai tekanan yang berkepanjangan dapat menyebabkan ulserasi pada kaki (Perezfavila *et al.*, 2019).

f. Infeksi

Bakteri yang dominan pada infeksi kaki adalah aeroik gram positif kokus seperti *Staphylococcus aureus* dan *β -hemolytic streptococci*. Banyak terdapat jaringan lunak pada telapak kaki yang rentan terhadap infeksi serta penyebaran yang mudah dan cepat ke dalam tulang sehingga dapat mengakibatkan osteitis. Ulkus ringan pada kaki apabila tidak ditangani dengan benar dapat dengan mudah berubah menjadi osteitis/osteomyelitis dan ganggrene. Kadar gula darah yang buruk, disfungsi imunologi dengan gangguan aktivitas leukosit dan fungsi komplemen mengakibatkan perkembangan infeksi jaringan yang invasif. Polymicrobial (*Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, infeksi *Escherichia coli* dan bakteri gram negatif lainnya) sering terjadi, begitu juga dengan adanya antibiotik strain bakteri resisten, terutama methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) dalam 30-40% kasus (Bandyk, 2018).

2.2.4. Patogenesis

Patogenesis ulkus kaki diabetes yaitu akibat komplikasi mikrovaskuler dan makrovaskuler sangatlah kompleks. Peran keduanya dalam ulkus kaki diabetes dapat menimbulkan neuropati dan gangguan vaskuler berupa aterosklerosis. Kombinasi peran dari neuropati (sensorik, otonom, motorik); trauma karena tekanan plantar yang meningkat dan deformitas sendi; gangguan vaskuler perifer; infeksi dan kegagalan penyembuhan luka akan menimbulkan ulkus kaki diabetes.

Umumnya patogenesis ulkus kaki diabetes disebabkan oleh kombinasi dari insufisiensi arteri pada tungkai bawah, neuropati tungkai bawah yang memicu

terjadinya perubahan bentuk kaki, dan pembentukan kalus karena hipohidrosis atau anhidrosis. Abnormalitas stres biomekanik pada kaki lebih lanjut akan menjadi faktor yang berperan pada timbulnya ulkus kaki diabetes dan trauma lokal. Dari 20% pasien dengan ulkus kaki diabetes yang diakibatkan oleh aliran darah arteri yang tidak adekuat. 50%-nya mempunyai diabetes neuropati dan 30%-nya ditimbulkan oleh keduanya.

Gangguan penyembuhan yang terjadi pada ulkus kaki diabetes disebabkan oleh sejumlah faktor dan diperkirakan melibatkan dari beberapa faktor tersebut. Faktor seluler yang diperkirakan terlibat dalam lambatnya penutupan luka dan faktor lain juga yang terlibat adalah perubahan dalam metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang dihasilkan dari defisiensi atau tidak adanya insulin, dimana hiperglikemia memulai pada glikasi non-enzimatik (A. Yuda Handaya, 2016).

2.2.5. Tanda dan Gejala Klinis

Menurut (Roza *et al.*, 2015), tanda dan gejala ulkus diabetikum dapat dilihat dari:

- a. Penurunan denyut nadi arteri dorsalis pedis, tibialis, poplitea, kaki menjadi atrofi, kaku, sering kesemutan, dingin, kaku menjadi tebal dan kulit kering.
- b. Eksudat, yaitu adanya eksudat atau cairan pada luka sebagai tempat berkembangnya bakteri.
- c. Edema, di sekitar kulit yang mengalami ulkus diabetikum sebagian besar akan terjadi edema kurang dari 2 cm, berwarna merah muda, dan inflamasi minimal. Edema pada ulkus diabetikum terdiri dari edema minimal yaitu sekitar 2 cm, sedangkan (semua kaki) dan berat (kaki dan tungkai).

- d. Inflamasi, terjadi dapat berupa inflamasi ringan, sedang, berat atau tanpa inflamasi. Warna: merah muda, eritema, pucat, gelap.
- e. Nyeri pada kaki saat istirahat, kepekaan atau nyeri sebagian besar tidak lagi terasa atau kadang-kadang dan tanpa maserasi atau kurang dari 25% dan maserasi: tanpa maserasi atau 25%, 26-50%, > 50% (Roza *et al.*, 2015).

2.2.6. Faktor Risiko Ulkus Diabetikum

- a. Lama menderita penyakit diabetes mellitus (≥ 10 tahun)

Semakin lama seseorang menderita diabetes melitus menyebabkan pasien mengalami keadaan hiperglikemia yang lama dan semakin besar peluang untuk menderita hiperglikemia kronik. Keadaan hiperglikemia yang terus menerus menyebabkan terjadinya hiperglisolia yaitu keadaan sel yang kebanjiran glukosa. Hiperglisolia kronik akan mengubah homeostasis biokimiawi sel tersebut yang kemudian berpotensi untuk terjadinya perubahan dasar terbentuknya komplikasi kronik melitus (Roza *et al.*, 2015).

- b. Kontrol gula darah yang buruk

Kadar gula darah yang tidak terkontrol dengan baik dapat mempercepat perkembangan retinopati diabetic, nefropati dan neuropati pada pasien diabetes melitus dengan ketergantungan insulin (Lim *et al.*, 2017). Pasien diabetes dengan hiperglikemia yang tidak terkontrol dapat menyebabkan neuropati dan dapat terkena komplikasi mikrovaskuler dan neuropati. Terjadinya neuropati dapat meningkatkan risiko ulserasi kaki karena peningkatan beban tekanan dan gaya geser (Mariam *et al.*, 2017).

- c. Usia (≥ 60 tahun)

Kejadian ulkus diabetikum juga berkaitan dengan umur ≥ 60 tahun karena pada usia tua, fungsi tubuh secara fisiologi mengalami penurunan karena proses aging seperti sekresi atau resistensi insulin yang menurun sehingga kemampuan fungsi tubuh dalam mengendalikan glukosa darah yang tinggi tidak optimal.

d. Obesitas

Pada pasien obesitas dengan indeks masa tubuh atau IMT $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ (wanita) dan IMT $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (pria) atau berat badan relatif (BBR) lebih dari 120% akan lebih sering terjadi resistensi insulin. Hiperinsulinemia adalah keadaan dimana yang menunjukkan apabila kadar insulin melebihi $10 \text{ } \mu\text{U/ml}$, dapat menyebabkan aterosklerosis yang berdampak pada vaskulopati, sehingga terjadi gangguan sirkulasi darah sedang/besar pada tungkai yang menyebabkan tungkai lebih mudah mengalami ulkus diabetikum (Chen *et al.*, 2019).

e. Perawatan kaki yang tidak teratur

Timbulnya luka infeksi yang berkembang menjadi ulkus diabetikum dapat disebabkan karena perawatan kaki yang tidak teratur. Perawatan kaki seperti memeriksa kondisi kaki, menjaga kebersihan dan kelembaban kaki, perawatan kuku dapat mengurangi risiko terjadinya ulkus diabetikum.

f. Kurangnya aktivitas fisik

Berolahraga adalah suatu aktivitas fisik yang sangat bermanfaat untuk meningkatkan sirkulasi darah, menurunkan berat badan dan memperbaiki sensitivitas terhadap insulin, sehingga akan memperbaiki kadar glukosa darah. Kadar glukosa darah yang terkendali dapat mencegah risiko terjadinya komplikasi DM seperti ulkus diabetikum.

g. Penggunaan alas kaki yang tidak tepat

Kejadian ulkus diabetikum dapat diturunkan dengan penggunaan alas kaki yang benar, karena dengan menggunakan alas kaki yang tepat, tekanan pada plantar kaki dapat dikurangi dan mencegah serta melindungi kaki agar tidak tertusuk benda tajam.

h. Pengetahuan yang kurang

Pengetahuan yang kurang dapat menyebabkan penderita tidak berusaha untuk mencegah terjadinya ulkus diabetikum, sehingga jarang mengontrol kadar gula darah dan tidak mematuhi diet DM. Selain itu pasien tidak melakukan penanganan segera apabila mengalami luka yang pada akhirnya berdampak terjadinya ulkus diabetikum. Pengetahuan yang tinggi tentang perawatan pasien dengan ulkus diabetikum, memiliki kemungkinan besaar untuk melakukan pencegahan sehingga mengurangi risiko ulkus diabetikum (Suryati *et al.*, 2019).

2.2.7. Penatalaksanaan Ulkus Diabetikum

a. Tujuan Penatalaksanaan

Tujuan utama penatalaksanaan ulkus diabetikum ialah untuk mengakses proses kearah penyembuhan luka secepat mungkin karena perbaikan dari ulkus dapat menurunkan kemungkinan terjadinya amputasi dan kematian pasien diabetes. Secara umum pengelolaan ulkus diabetikum meliputi penanganan iskemia, debridemen, penanganan luka, menurunkan tekanan plantar pedis (*off-loading*), penanganan bedah, penanganan komorbiditas dan menurunkan risiko kekambuhan serta pengelolaan infeksi (Frykberg *et al.*, 2000; Munro. *et al.*, 2003).

b. Tata Cara Penatalaksanaan

1. Penanganan iskemia

Perfusi arteri merupakan hal penting dalam proses penyembuhan dan harus dinilai awal pada pasien ulkus diabetikum. Penilaian kompetensi vaskular pedis pada ulkus diabetikum seringkali memerlukan bantuan pemeriksaan penunjang seperti MRI angiogram, *doppler* maupun angiografi. Pemeriksaan sederhana seperti perabaan pulsasi arteri poplitea, tibialis posterior dan dorsalis pedis dapat dilakukan pada ulkus diabetikum kecil yang tidak disertai edema ataupun selulitis yang luas. Ulkus atau gangren kaki tidak akan sembuh bahkan dapat menyerang tempat lain di kemudian hari bila penyempitan pembuluh darah kaki tidak diatasi (Waspadji, 2009; Bowering, 2001; Boike dan Hall, 2002).

2. Debridemen

Debridemen adalah upaya untuk membersihkan semua jaringan nekrotik, karena luka tidak akan sembuh bila masih terdapat jaringan *nonviable*, debris dan fistula. Tindakan debridemen juga dapat menghilangkan koloni bakteri pada luka (Frykberg, 2000; Clayton dan Elasi, 2009). Tujuan debridemen yaitu untuk mengevakuasi jaringan yang terkontaminasi bakteri, mengangkat jaringan nekrotik sehingga dapat mempercepat penyembuhan, menghilangkan jaringan kalus serta mengurangi risiko infeksi lokal (Munro *et al.*, 2003).

3. Perawatan luka

Prinsip perawatan luka adalah menciptakan lingkungan *moist wound healing* atau menjaga agar luka senantiasa dalam keadaan lembab (Frykberg *et al.*, 2000; Bowering, 2001). Bila ulkus memproduksi sekret banyak maka untuk pembalut (*dressing*) digunakan yang bersifat absorben. Sebaliknya bila ulkus kering maka digunakan pembalut yang mampu melembabkan ulkus. Bila ulkus cukup lembab,

maka dipilih pembalut ulkus yang dapat mempertahankan kelembaban (Waspadji, 2009; Clayton dan Elasi, 2009).

4. Menurunkan tekanan pada plantar pedis (*off-loading*)

Tindakan *off-loading* adalah salah satu prinsip utama dalam penatalaksanaan ulkus kronik dengan dasar neuropati. Tujuan dari tindakan ini yaitu untuk mengurangi tekanan pada telapak kaki (Waspadji, 2009; Munro *et al.*, 2003). Metode yang dipilih untuk *off-loading* tergantung dari karakteristik fisik pasien, lokasi luka, derajat keparahan dan ketaatan pasien (Frykberg *et al.*, 2000).

5. Penanganan bedah

Tindakan bedah dilakukan untuk mencegah terjadinya ulkus berulang pada pasien yang mengalami neuropati dengan melakukan koreksi deformitas sendi, tulang atau tendon. Bedah yang dilakukan ada dua jenis, yaitu bedah kuratif dan bedah emergensi. Bedah kuratif diindikasikan bila ulkus tidak sembuh dengan perawatan konservatif, misalnya angioplasti atau bedah vaskular. Sedangkan bedah emergensi adalah tindakan yang paling sering dilakukan, dan diindikasikan untuk menghambat atau menghentikan proses infeksi, misalnya ulkus dengan daerah infeksi yang luas. Tindakan bedah emergensi dapat berupa amputasi atau debridemen jaringan nekrotik (Frykberg *et al.*, 2006).

6. Penanganan komorbiditas

Diabetes adalah penyakit sistemik multiorgan sehingga komorbiditas lain harus dinilai dan dikelola melalui pendekatan tim multidisiplin untuk mendapatkan hasil yang optimal. Komplikasi kronik lain baik mikro maupun makroangiopati yang menyertai harus diidentifikasi dan dikelola secara holistik.

Kepatuhan pasien juga merupakan salah satu hal yang penting dalam menentukan hasil pengobatan (Frykberg *et al.*, 2000).

7. Mencegah kambuhnya ulkus

Pencegahan dianggap sebagai elemen kunci dalam menghindari amputasi. Pasien diajarkan untuk memperhatikan kebersihan kaki, memeriksa kaki setiap hari, menggunakan alas kaki yang tepat, mengobati segera jika ada luka, pemeriksaan rutin ke podiatri, termasuk debridemen pada kapalan dan kuku kaki yang tumbuh kedalam (Amstrong dan Lavery, 1998).

8. Pengelolaan infeksi

Pengelolaan infeksi biasanya diberikan antibiotik. Antibiotik merupakan zat yang dihasilkan dari suatu mikroba seperti bakteri dan jamur, dimana zat tersebut dapat membunuh mikroba atau menghambat pertumbuhan mikroba. Beberapa antibiotik bersifat aktif terhadap beberapa spesies bakteri, namun ada juga antibiotik yang bersifat spesifik terhadap bakteri tertentu. Antibiotik yang biasa diberikan pada pasien ulkus diabetikum seperti karbapenem, meropenem, sefamisin, fosfomisin, nitrofurantoin, inhibitor beta-laktamase (asam klavulanik, tazobaktam, atau sulbaktam), antibiotik non beta-laktamase dan kolistin. Kebanyakan bakteri penyebab ulkus diabetikum sudah mengalami resistensi terhadap golongan beta-laktam (Forbes dan Weissfeld, 2007).

2.3. Bakteri

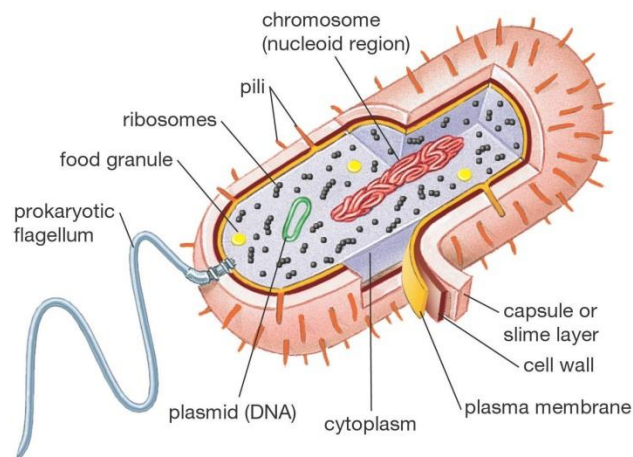
2.3.1. Definisi

Bakteri berasal dari bahasa Latin bacterium; jamak; bacteria adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini

termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik) (Maryati *et al.*, 2007).

Bakteri merupakan organisme prokariotik bersel tunggal yang hidup bebas dan tidak berklorofil, mempunyai DNA dan RNA serta mampu menunjukkan semua proses-proses dasar kehidupan seperti metabolisme, tumbuh dan berkembang biak, memiliki habitat alami yang beragam seperti air, udara, tanah, makanan dan organisme tingkat tinggi. Pada beberapa habitatnya bakteri sebagai organisme normal, tetapi karena suatu keadaan tertentu jumlah bakteri tersebut dapat meningkatkan dan menyebabkan penyakit pada manusia. Bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia adalah bakteri patogen (Jawetz, 2010; Darmadi, 2008).

2.3.2. Struktur Bakteri



Gambar 2. Struktur Bakteri (Jawetz, 2010)

Struktur dasar bakteri (dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri), meliputi (Singleton, 1981):

1. Dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan, yaitu gabungan protein dan polisakarida. Ketebalan peptidoglikan membagi bakteri menjadi bakteri gram

positif bila peptidoglikannya tebal dan bakteri gram negatif bila peptidoglikannya tipis.

2. Membran plasma, yaitu membran yang menyelubungi sitoplasma tersusun atas lapisan fosfolipid dan protein.
3. Sitoplasma adalah cairan sel yang terdiri dari 80% air. Selain air juga mengandung asam nukleat, protein, karbohidrat dan lipid.
4. Ribosom, adalah organel yang tersebar dalam sitoplasma, tersusun atas protein dan RNA.
5. Granula penyimpan, karena bakteri menyimpan cadangan makanan yang dibutuhkan.

2.3.3. Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan antara lain (Jawetz, 2010):

a. Nutrisi bakteri

Nutrisi bakteri untuk sintesis protoplasma dan menyediakan energi bagi semua proses kehidupan bakteri. Nutrisi harus larut di dalam air supaya dapat memasuki sel bakteri. Sumber nutrisi yang diperlukan bakteri antara lain karbon, nitrogen, ion-ion organik, metabolit penting seperti vitamin dan asam amino.

b. Kebutuhan oksigen

Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, bakteri dikelompokkan menjadi dua kelompok umum, yaitu bakteri aerob dan bakteri anaerob. Bakteri aerob membutuhkan oksigen bebas untuk pertumbuhannya sementara bakteri anaerob akan mati dengan adanya oksigen bebas.

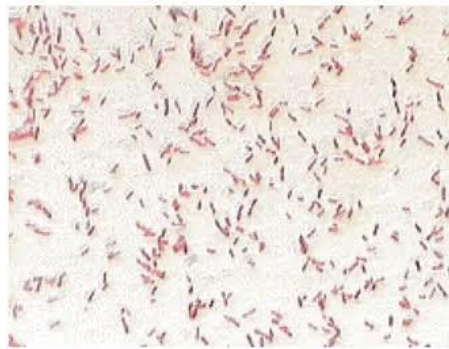
c. Suhu

Suhu harus diatur bagi pertumbuhan bakteri, beberapa bakteri dapat tumbuh dibawah suhu 10°C sedangkan yang lain dapat tumbuh pada suhu setinggi 70°C. Bakteri yang dapat menyebabkan penyakit lazimnya tumbuh paling baik sekitar suhu manusia yang normal, yaitu 37°C.

d. pH

Bakteri umumnya tidak tumbuh dalam kondisi terlalu basa, kecuali basil kolera. Bakteri paling baik tumbuh pada pH netral sekitar 7 atau pada pH yang sedikit basa sekitar pH 7,4. Namun tidak jarang dijumpai bakteri yang tumbuh baik pada pH 4 atau 5.

2.3.4. Bakteri *Proteus sp.*



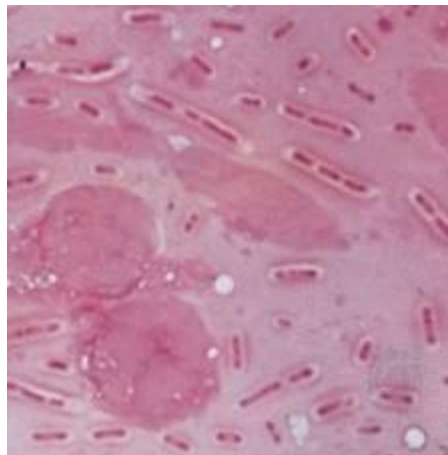
Gambar 3. Morfologi *Proteus sp.*
(Sumber. <http://lookfordiagnosis.com>, 2009)

Menurut Jawetz (2005) *Proteus sp.* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Proteus
Spesies	: <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus morganii</i>

Proteus sp. merupakan bakteri bentuk batang, gram negatif, tidak berspora, tidak berkapsul, berflagel peritrik, bakteri ini berukuran $0,4 - 0,8 \times 1,0 - 3,0 \mu\text{m}$. *Proteus sp.* termasuk dalam bakteri non laktosa fermenter, bersifat fakultatif aerob/anaerob (Wahyu, 2005). *Proteus sp.* sering ditemukan di tanah, air dan merupakan flora normal pada saluran pencernaan manusia. Bakteri ini menyebabkan infeksi pada manusia apabila manusia mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut (Jawetz, 2005).

2.3.5. Bakteri *Klebsiella sp.*



Gambar 4. *Klebsiella sp.* (Levan dan Jacob, 2010)

Berikut ini merupakan taksonomi dari bakteri *Klebsiella sp.* (Kurniawan dan Indra, 2018):

Kingdom	: Bacteriae
Phylum	: Proteobacteria
Classis	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Species	: <i>Klebsiella sp.</i>

Beberapa spesies *Klebsiella* sp antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Infeksi nosokomial oleh karena *Klebsiella* sp sebagian besar disebabkan oleh spesies *Klebsiella pneumoniae*. Selain itu terdapat pula *Klebsiella oxytoca* yang telah diisolasi dari spesimen klinis manusia, namun persentasenya jauh di bawah *Klebsiella pneumoniae* (Mardiyantoro, 2018).

2.4. Extended Spectrum β Lactamase (ESBL)

Extended Spectrum β Lactamases (ESBL) adalah enzim plasmid yang memerantarai terjadinya hidrolisis dan inaktivasi dari antibiotika beta-laktam termasuk sefalosporin generasi ketiga, penisilin dan aztreonam (Aztal, 2004). Enzim ini adalah hasil mutasi dari enzim beta-laktamase TEM-1, TEM-2 dan SHV-1 yang biasa ditemukan pada famili *Enterobacteriaceae*, yang secara normal akan memberikan resistensi pada penisilin dan sefalosporin generasi pertama (Chaudary, 2004).

Hidrolisis antibiotik beta-laktam oleh enzim beta laktamase adalah mekanisme yang paling sering mendasari terjadinya resistensi terhadap antibiotik golongan beta-laktam pada bakteri gram negatif yang penting secara klinis (Bush dan Jacoby, 2010). Kemampuan galur ESBL menghidrolisis antibiotik beta-laktam secara luas disebabkan adanya sejumlah mutasi pada gen TEM maupun SHV. Mutasi tersebut umumnya mengenai daerah active site dari enzim sehingga aktivitas enzim tersebut meningkat (Peterson dan Bronomo, 2005).

Faktor resiko terjadinya kolonisasi kuman ESBL pada manusia ialah lamanya pemakaian antibiotika, lama perawatan di ICU/Rumah Sakit, dan instrumentasi/kateterisasi dan penyakit besar (*Severe illness*) (Paterson dan

Bronomo, 2005; Nathisuwan *et al.*, 2001). Secara epidemiologi prevelensi penyebaran ESBL di berbagai negara di dunia berbeda-beda. Di Amerika Latin 42,7%, Amerika Utara 5,8%, Eropa 2%-31%. Di Indonesia prevelensi infeksi oleh bakteri penghasil ESBL mencapai 65% (Sharma *et al.*, 2009).

2.5. Resistensi Antibiotik

2.5.1. Resistensi Bakteri Terhadap Antibiotik

Resistensi adalah suatu keadaan karena pengaruh obat antiinfeksi terhadap kuman berkurang khasiatnya atau kuman tersebut tidak sensitif oleh perlakuan obat antiinfeksi. Resistensi merupakan kegagalan pengobatan dengan suatu antibiotika dengan dosis terapi (Gran, 1983).

Resistensi sel mikroba ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba. Sifat ini merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup (Setiabudy dan Gan, 1995). Beberapa bakteri mempunyai kemampuan alamiah alami untuk kebal atau resistensi terhadap efek pengobatan, misal dengan antibiotik, meskipun tidak berinteraksi secara langsung. Hal ini dapat terjadi karena bakteri mempunyai enzim yang dapat merusak obat (Brander *et al.*, 1991). Sebab-sebab terjadinya resistensi dapat dibagi menjadi:

a. Non Genetik

Penggunaan antimikroba yang tidak sesuai aturan menyebabkan tidak seluruh mikroba dapat terbunuh. Beberapa mikroba yang masih bertahan hidup kemungkinan akan mengalami resistensi saat digunakan antimikroba yang sama. Proses ini dinamakan dengan seleksi (Jawetz *et al.*, 2001).

b. Genetik

Terjadinya resistensi kuman terhadap antibiotika umumnya terjadi karena perubahan genetik. Perubahan genetik bisa terjadi secara kromosomal maupun ekstra kromosomal, dan perubahan genetik tersebut dapat ditransfer atau dipindahkan dari satu spesies kuman kepada spesies kuman lain melalui berbagai mekanisme (Anonim, 1994).

c. Resistensi Silang

Suatu populasi kuman yang resisten terhadap suatu obat tertentu dapat pula resisten terhadap obat yang lain yang dapat mempunyai mekanisme kerja obat yang mirip satu sama lain. Hal ini misalnya terjadi pada obat-obatan yang komposisi kimianya hampir sama (Anonim, 1994).

2.5.2. Mekanisme Terjadinya Resistensi Antibiotik

Perubahan-perubahan dasar dalam hal kepekaan mikroorganisme terhadap antimikroba tanpa memandang faktor genetik yang mendasarinya adalah terjadinya keadaan-keadaan sebagai berikut:

1. Dihasilkannya enzim yang dapat menguraikan antibiotik seperti enzim penisilinase, sefalosporinase, fosforilase, adenilase dan asetilase.
2. Perubahan permeabilitas sel bakteri terhadap obat.
3. Meningkatnya jumlah zat-zat endogen yang bekerja antagonis terhadap obat.
4. Perubahan jumlah reseptor obat pada reseptor obat pada sel bakteri atau sifat komponen yang mengikat obat pada targetnya.

Resistensi bakteri dapat terjadi secara intrinsik maupun didapat. Resistensi intrinsik terjadi secara kromosomal dan berlangsung melalui multiplikasi sel yang akan diturunkan pada turunan berikutnya. Resistensi yang didapat dapat

terjadi akibat mutasi khromosomal atau akibat transfer DNA (Neu dan Gootz, 2001).

2.5.3. Uji Resistensi Terhadap Antibiotik

Keterbatasan antibiotik untuk menimbulkan efek pada hospes, mendorong untuk dilakukan uji sensitivitas dari galur bakteri yang di isolasi dari hewan sakit untuk menentukan jenis antibiotik yang tepat. Uji ini dikembangkan untuk menentukan kemampuan mengambat beberapa galur bakteri dengan satu jenis antibiotik (Brander *et al.*, 1991). Ada dua macam metode untuk uji sensitivitas yaitu:

a. Dilusi

Pada prinsipnya antibiotik diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Metode yang dipakai ada dua macam, yaitu metode dilusi kaldu disebut juga dengan dilusi cair dan metode dilusi agar atau dilusi padat. Ada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman atau bakteri dalam media agar, lalu ditanami bakteri. Pertumbuhan bakteri ditandai oleh adanya kekeruhan setelah 16-20 jam diinkubasi. Konsentrasi rendah yang menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan, dan disebut dengan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Masing-masing konsentrasi antibiotik yang menunjukkan hambatan pertumbuhan ditanam pada agar padat media pertumbuhan bakteri dan diinkubasi. Konsentrasi terendah dari antibiotik yang membunuh 99,9% inokulum bakteri tersebut Konsentrasi Bakterisid Minimal (Brander *et al.*, 1991).

b. Difusi

Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dan telah diketahui konsentrasinya. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah agar Mueller Hinton (Jawetz *et al.*, 2001). Ada beberapa cara pada metode difusi ini, yaitu:

1) Cara Kirby-Bauer

Metode difusi cakram adalah cara yang digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap suatu antibiotik. Pada cara ini menggunakan suatu cakram kertas saring (*paper disk*) yang memiliki fungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan media agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan selama 18-24 jam, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Hasil pengamatan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona bening yang berbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar dan Chan, 1988).

2) Cara Joan-Stokes

Prosedurnya cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara ini, prosedur tes sensitivitas untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Harley, 2002).

2.6. ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik yang digunakan untuk memperbanyak urutan DNA tertentu secara *in vitro* dengan cara pemanjangan primer sebagai prekursor menggunakan DNA polymerase (Williams *et al.*, 1988).

A. Prinsip-prinsip umum PCR

Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR ialah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl₂) dan enzim polimerase DNA.

PCR merupakan suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier (Newton and Graham, 1994).

B. Pelaksanaan PCR

Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti:

1) Templat DNA

Fungsi DNA templat di dalam proses PCR yaitu sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari tujuan eksperimen.

2) Primer

Di dalam proses PCR, primer memiliki fungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan di amplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari database GenBank. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat.

3) dNTPs (deoxynucleotide triphosphates)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang

komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan.

4) Buffer PCR dan $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses. Umumnya buffer PCR sudah mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan. Tetapi disarankan sebaiknya antara $MgCl_2$ dan buffer PCR dipisahkan supaya dapat dengan mudah dilakukan variasi konsentrasi $MgCl_2$ sesuai yang diperlukan.

5) Enzim Polimerase DNA

Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur $95^{\circ}C$. Aktivitas polimerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi.

Dengan menggunakan teknik PCR, panjang fragmen DNA dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Amplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari 3 kilo basa) relatif lebih mudah dilakukan. Untuk mengamplifikasi fragmen

DNA panjang (lebih besar dari 3 kilo basa) memerlukan beberapa kondisi khusus, di antaranya adalah diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas yang tinggi (High-salt buffer) (Innis, 1990).

2.7. Elektroforesis

Setelah proses replikasi DNA selesai melalui proses PCR, kemudian DNA dilakukan visualisasi menggunakan proses elektroforesis. Elektroforesis adalah alat untuk menguji DNA secara kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan DNA dalam gel (Bello, 2001). Elektroforesis adalah studi dasar dalam studi isozim dan allozim. Penggunaan metode elektroforesis dapat menggunakan gerakan protein dan enzim dalam gel buffer karena adanya aliran arus listrik. Elektroforesis adalah perpindahan partikel bermuatan di dalam medan listrik. Metode ini dapat digunakan untuk memisahkan molekul makro dengan ukuran dan muatan listrik yang berbeda. Teknik elektroforesis dapat digunakan dalam studi populasi genetik guna mengetahui perbedaan diantara individu-individu dalam populasi. Studi variasi lisozim dalam taksonomi tumbuhan memberikan sumbangan penting dalam mengkaji kekerabatan antar spesies atau antar individu (Soodjono, 2004).

2.8. Metoda Sekuensing DNA

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA adalah teknik kunci dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika (Franca *et al.* 2002). Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA. Metode sekuensing DNA yang pertama kali digunakan (*first generation*

sequencing) dikenal dengan metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Teknologi sekuensing dari Sanger ini dan modifikasinya mendominasi metode sekuensing selama 30 tahun (Sanger *et al.* 1997). Pengurutan (*sequencing*) asam nukleat memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Sekuensing DNA selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas ataupun fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Glick, 2010; Rogers, 2011).

2.9. BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) adalah algoritma dan program bioinformatika yang digunakan untuk membandingkan informasi sekuens primer biologi seperti sekuens asam amino untuk protein atau sekuens nukleotida (DNA dan RNA). Fitur BLAST merupakan salah satu fitur penting dalam gene database terbesar, NCBI, yang sangat berguna sebagai mesin pencarian sekuens nukleotida maupun asam amino. Dengan menggunakan BLAST, peneliti mampu membandingkan urutan protein atau urutan nukleotida yang tidak diketahui identitasnya (disebut query) dengan pustaka atau database sekuens yang ada di database NCBI dan mengidentifikasi sekuens serupa atau yang memiliki similaritas dengan sekuens yang ada di database dan sudah diidentifikasi (Effendi, 2018).

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Juli - November 2022 di RSUP Dr. M. Djamil Padang dan diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Diagnostik dan Riset Terpadu Penyakit Infeksi Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang.

3.2. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif. Data penelitian yang diambil dari pus pasien ulkus diabetikum di RSUP Dr. M. Djamil Padang. Sampel tersebut kemudian diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Diagnostik dan Riset Terpadu Penyakit Infeksi Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas Padang, dengan menggunakan metode Molekuler.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah pasien dengan diagnosa penyakit ulkus diabetikum tidak disertai dengan penyakit penyerta infeksi lain di RSUP Dr. M. Djamil Padang pada bulan Juli - November 2022.

3.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pus pasien ulkus diabetikum yang di rawat di bangsal Interne RSUP Dr. M. Djamil Padang pada bulan Juli - November 2022 yang memenuhi kriteria inklusi.

A. Kriteria Inklusi

1. Pasien yang di diagnosis ulkus diabetikum, tanpa penyakit penyerta infeksi lain.
2. Pasien ulkus diabetikum yang bersedia menjadi panelis.

B. Kriteria Eksklusi

1. Pasien diabetes dengan diagnosis ulkus diabetikum yang tidak bersedia untuk ikut dalam penelitian.
2. Pasien ulkus diabetikum yang sudah sembuh.
3. Pasien ulkus diabetikum yang melakukan rawat jalan.

3.4. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah dengan menggunakan teknik *total sampling* yaitu teknik pengambilan sampel dimana jumlah sampel sama dengan populasi. Alasan pengambilan *total sampling* dikarenakan jumlah populasi yang kurang dari 100, sehingga seluruh populasi dijadikan sampel penelitian (Sugiyono, 2011).

3.5. Instrumen Penelitian

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah handscoon, masker, tisu, wadah steril, cotton swab steril, cawan petri (Petrío[®]), tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, Erlenmeyer (Pyrex[®]), magnetic stirer, bunsen, mikroskop, kaca objek, penggaris, ose, autoklaf (All American[®]), inkubator (Gallenkamp[®]), pinset, lemari pendingin, jangka sorong, pipet mikro (Tranferpette[®]), tip berbagai ukuran (0,5-10 µl, 10 100 µl, 100-1000 µl), kapas steril, aluminium foil, label, DensiCheck digital, tempat pembuangan alat dan

bahan habis pakai infeksius, vortex, sentifuge, mesin PCR, mikrotube dan box sampel, Thermo scientific, mesin electrophoresis, alat sekuensing DNA, kotak gel dan sisir agarose, UV Transluminator, timbangan analitik, alat tulis dan buku.

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pus ulkus pasien diabetikum yang di rawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pembuatan media penanaman sampel: Blood Agar dan darah domba, Mueller Hinton Agar dan aquadest. Uji resistensi antibiotik: Mueller Hinton Agar, NaCl 0,9%, Mc Farland 0,5, Disk antibiotik. Untuk isolasi DNA: Phosphate Buffer Saline (PBS), TE Buffer. Untuk PCR: Cetakan DNA, primer 16s rRNA digunakan primer forward: 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3', dan primer reverse: 3'ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT5', untuk mendeteksi gen bla CTX-M, digunakan primer forward: 5'ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC3' dan primer reverse: 3' TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG5', gen bla TEM digunakan primer forward: 5'ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG3' dan primer reverse: 3'CCA ATG CTT ATT CAG TGA GG5', untuk gen bla SHV digunakan primer forward: 5'ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC3' dan primer reverse: 3'ATG GCG TTA CCT TTG ACC5', deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, enzim DNA Polimerase, larutan buffer PCR umumnya mengandung 10-50 mM Tris-HCl pH 8,3-8,8; 50 mM KCl; 0,1%, gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 0,1%; 1,5 mM MgCl₂. Lalu elektroforesis: agarose, buffer, PCR produk/sampel DNA, parafilm, ladder (One KB), dan pewarna (loading dye).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi adalah tindakan untuk membebaskan alat atau media dari jasad renik. Alat-alat yang akan disterilkan dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Kemudian cawan petri dibungkus dengan kertas perkamen. Sedangkan alat-alat gelas (tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer) ditutup dengan menggunakan kapas lalu dibalut dengan kasa dan dibungkus dengan kertas perkamen. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Ose, pinset dan kaca objek disterilisasi dengan cara dibakar pada nyala api lampu bunsen hingga terlihat merah berpijar, dimulai dari pangkal kawat ke ujung ose.

3.6.2. Isolasi Bakteri

3.6.2.1. Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil berupa pus ulkus dari pasien penderita diabetes melitus tanpa penyakit infeksi lain di RSUP Dr. M. Djamil Padang sesuai dengan kriteria inklusi. Ulkus dibersihkan dengan kain kasa steril yang telah dibasahi NaCl fisiologis secara hati-hati, kemudian dilakukan perlakuan tersebut sebanyak 2 kali pengulangan. Ulkus dipencet dan usapkan dengan menggunakan kapas lidi steril ke bagian ulkus tanpa mengenai tepi ulkus. Masukkan hasil swab ulkus ke dalam wadah steril. Tutup tabung dengan erat dan diberi nama menggunakan label (Nur. A., dan Marissa, 2016). Sampel swab ulkus kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Diagnostik dan Riset Terpadu Penyakit Infeksi Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang.

3.6.2.2. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

a. Media Blood Agar

40 g serbuk Blood Agar dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Setelah disterilkan ditambahkan darah domba segar sebanyak 50 mL, dicampur hingga rata, lalu dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL.

b. Mueller Hinton Agar

Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan melarutkan bahan sebanyak 38 gram (dengan komposisi: Beef dehydrate infusion 300 g, Casein hydrolysate 17.5 g, Starch 1.5 g dan Agar 15 g) ke dalam 1 L aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan magnetic stirer untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis di dalam LAF (Hafsan *et al.*, 2015).

3.6.2.3. Penanaman Bakteri pada Media Pertumbuhan

Hasil swab dari pus ulkus yang telah diambil akan diinokulasi dengan menggunakan ose bulat pada media Blood Agar, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Suhartati dan Faidah, 2014).

3.6.3. Identifikasi ESBL

3.6.3.1. Pembuatan Media Uji ESBL

Sebanyak 38 gram Mueller Hinton Agar dilarutkan dalam 1 L aquadest, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit, setelah steril dituang kedalam cawan petri sebanyak 15 mL.

3.6.3.2. Penyiapan Disk Antibiotik Uji ESBL

Disk antibiotik yang digunakan dengan konsentrasi yang telah ditetapkan sebagai berikut:

Tabel 1. Disk antibiotik yang digunakan

NO.	ANTIBIOTIK	KONSENTRASI (µg)	PRODUKSI
1.	Ceftazidime	30	OXOID
2.	Cefotaxime	30	OXOID
3.	Ceftriaxone	30	OXOID
4.	Amoxicillin	25	OXOID
5.	Amoxicillin + Asam Clavulanat	30	OXOID

3.6.3.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni diambil dari media Mueller Hinton Agar menggunakan jarum ose, lalu disuspensikan ke dalam pelarut NaCl 0,9% sebanyak 3 mL kemudian di kocok dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan vortex. Kekeruhan dari suspensi dibandingkan dengan standar McFarland 0,5.

3.6.3.4. Pembuatan Standar McFarland

Cara pembuatan standar McFarland 0,5 adalah $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175% diambil 0,05 ml dan H_2SO_4 1% diambil 9,95 mL homogenkan kedua larutan tersebut dan ukur dengan spektrofotometer 625 nmλ, dapatlah absorbansi larutan standar. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Munfaati, *et al.*, 2014).

3.6.3.5. Penentuan Sensitivitas Antibiotik dengan Metoda Difusi Agar

Suspensi bakteri diambil dengan kapas lidi steril dan ditanam pada media Mueller Hinton Agar dengan cara mengoleskan secara merata pada permukaan media, kemudian disk antibiotik diletakkan dengan hati-hati diatas permukaan media dan ditekan perlahan dengan pinset steril supaya benar-benar kontak dengan bakteri yang terdapat pada media. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Muhammad, *et al.*, 2017).

Tabel 2. Kriteria Diameter Zona Hambat Antimikroba (CLSI, 2018)

Diameter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≥ 20	<i>Susceptible</i> (kuat)
15-19	<i>Intermediate</i> (sedang)
≤ 14	<i>Resistant</i> (lemah)

3.6.3.6. Uji Skrining ESBL

Dituangkan media MHA (Mueller Hilton Agar) ke cawan petri yang steril, kemudian dibiarkan sampai media MHA mengeras. Lalu diambil 1 ujung ose

koloni bakteri dari media, kemudian disuspensikan di dalam larutan NaCl 0,9%. Suspense bakteri disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 CFU. Kemudian dengan lidi kapas steril dicelupkan kedalam suspense dan diusapkan keseluruh permukaan media MHA. Dibiarkan selama 5 menit agar menempel pada media MHA. Lalu diletakkan cakram antibiotika Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefotaxime, Amoxicillin dan Amoxicillin + Asam Clavulanat dengan jarak 15 mm pada media yang telah ditanami suspense kuman. Kemudian media ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°. Daerah bening yang terbentuk disekitar cakram antibiotik diukur diameternya, sebagai daya hambat antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri uji (Fatisa, 2013).

3.6.3.7. Uji Konfirmasi ESBL

Dari hasil uji skrining ESBL menunjukan bakteri resisten terhadap antibiotik Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefotaxime dan Amoxicillin. Sehingga dilanjutkan dengan uji konfirmasi golongan ESBL menggunakan metode Double Disk Sinergy Test (DDST) Amoxicillin dan Amoxicillin + Asam klavulanat. Dengan ketentuan, dinyatakan positif ESBL bila diameter zona hambat pada saat uji konfirmasi ≥ 5 mm (Julia Garamina *et al.*, 2017).

3.6.4. Identifikasi Gen CTX-M, TEM dan SHV

A. Isolasi DNA (Metode Boiling)

Set heating block dengan ketetapan suhu 95°C. Lalu suspensikan bakteri dalam 1 mL PBS. Setelah bakteri tersuspensi, sentrifus dengan kecepatan 14.000 Rpm selama 1 menit. Setelah disentrifus, buang supernatant lalu tambahkan 1 mL TE Buffer, vortex lalu inkubasi selama 10 menit dengan ketetapan suhu 95°C. Setelah di inkubasi, sentrifus kembali suspense bakteri tersebut dengan kecepatan

14.000 Rpm selama 1 menit. Dan terakhir, pindahkan supernatant ke dalam microtube 1,5 ml. lalu simpan dalam lemari pendingin (freezer) bila tidak langsung digunakan.

B. Proses Amplifikasi gen dengan metode PCR

DNA sampel kontrol positif yang telah diisolasi diperbanyak dengan metode PCR menggunakan primer CTX-M, TEM dan SHV. Dengan urutan basa dapat dilihat pada tabel 4 (Suwardana *et al.*, 2019; Hout *et al.*, 2015). Metode amplifikasi DNA ini digunakan Taq DNA Polymerase menggunakan *Go Taq Mastermix*. Komponen-komponen dan campuran yang digunakan untuk primer tersebut yaitu:

Tabel 3. Komponen dan campuran untuk primer dan DNA sampel

Pereaksi	Jumlah pereaksi (µL)
Templat DNA	0,75 µL
Go Taq Mastermix	6,25 µL
Primer Forward	0,25 µL
Primer Reverse	0,25 µL
Nuclease Free Water	5 µL
Volume Total	12,5 µL

Tabel 4. Keterangan Primer CTX-M, TEM dan SHV

Kode	Sekuen (Forward 5'→3'/Reverse 3'→5')	Ukuran Produk
CTX-M Forward CTX-M Reverse	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	539 bp
TEM Forward TEM Reverse	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG CCA ATG CTT ATT CAG TGA GG	858 bp
SHV Forward SHV Reverse	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC ATG GCG TTA CCT TTG ACC	1048 bp

Tabel 5. Siklus mesin PCR untuk optimasi gen bakteri dan primer

Jumlah siklus	Temperatur (°C)	Waktu
1	95	3 menit
35	90 (<i>denaturasi</i>)	30 detik
	52-62 (<i>annealing</i>)	30 detik
	72 (<i>extension</i>)	30 detik
1	Extension 72	5 menit
1	Cooling 12	Sampai selesai

Tiap-tiap komponen di masukkan ke dalam tube PCR, untuk DNA bakteri di masukkan terakhir agar tidak terkontaminasi. Lalu dihomogenkan dan di masukkan ke mesin PCR.

C. Pemeriksaan kualitatif DNA hasil isolasi dengan metode Elektroforesis

Prosedur ini diawali dengan pembuatan gel agarose 1,5% dengan cara menimbang 1,5 gram bentuk agarose, kemudian agarose dilarutkan dalam 100 mL TBE di dalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam pemanasan gel (sop

microwave[®]) selama 1-2 menit hingga larut dan diperoleh larutan jernih, lalu dituangkan pada cetakan gel yang telah dipasang sisir pembuat sumur sampel dan biarkan gel mengeras di suhu ruangan. Setelah mengeras, angkat sisir sehingga terbentuk sumur, kemudian masukkan gel ke dalam alat elektroforesis dan tuangkan TBE sampai gel terendam, 5 µL templat DNA hasil amplifikasi ditambah gel red 5 µL ke dalam sumur gel agarose, dan untuk campuran leader 1 µL *loading die* + 3 µL leader + 5 µL red. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1,5% dan menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit dengan untaian DNA CTX-M: 539 bp, TEM: 858 bp dan SHV: 1048 bp.

3.6.5. Identifikasi Bakteri ESBL

A. Isolasi DNA (Metode Boiling)

Set heating block dengan ketetapan suhu 95°C. Lalu suspensikan bakteri dalam 1 mL PBS. Setelah bakteri tersuspensi, sentrifus dengan kecepatan 14.000 Rpm selama 1 menit. Setelah disentrifus, buang supematant lalu tambahkan 1 mL TE Buffer, vortex lalu inkubasi selama 10 menit dengan ketetapan suhu 95°C. Setelah di inkubasi, sentrifus kembali suspensi bakteri tersebut dengan kecepatan 14.000 Rpm selama 1 menit. Dan terakhir, pindahkan supernatant ke dalam microtube 1,5 ml. lalu simpan dalam lemari pendingin (freezer) bila tidak langsung digunakan.

B. Proses Amplifikasi DNA dengan metode PCR

DNA sampel kontrol positif yang telah diisolasi diperbanyak dengan metode PCR menggunakan primer 16s rRNA. Dengan urutan basa dapat dilihat pada tabel 7 (Suwardana *et al.*, 2019). Metode amplifikasi DNA ini digunakan

Taq DNA Polymerase menggunakan *Go Taq Mastermix*. Komponen-komponen dan campuran yang digunakan untuk primer tersebut yaitu:

Tabel 6. Komponen dan campuran untuk primer dan DNA sampel

Pereaksi	Jumlah pereaksi (μL)
Templat DNA	0,75 μL
Go Taq Mastermix	6,25 μL
Primer Forward	0,25 μL
Primer Reverse	0,25 μL
Nuclease Free Water	5 μL
Volume Total	12,5 μL

Tabel 7. Keterangan Primer 16s rRNA

Kode	Sekuen (Forward 5'→3'/Reverse 3'→5')	Ukuran Produk
16s rRNA Forward	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1500 bp
16s rRNA Reverse	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT	

Tabel 8. Siklus mesin PCR untuk optimasi gen bakteri dan primer

Jumlah siklus	Temperatur (°C)	Waktu
1	95	3 menit
35	90 (<i>denaturasi</i>)	30 detik
	52-62 (<i>annealing</i>)	30 detik
	72 (<i>extension</i>)	30 detik
1	Extension 72	5 menit
1	Cooling 12	Sampai selesai

Tiap-tiap komponen di masukkan ke dalam tube PCR, untuk DNA bakteri di masukkan terakhir agar tidak terkontaminasi. Lalu dihomogenkan dan di masukkan ke mesin PCR.

C. Pemeriksaan kualitatif DNA hasil isolasi dengan metode Elektroforesis

Prosedur ini diawali dengan pembuatan gel agarose 1,5% dengan cara menimbang 1,5 gram bentuk agarose, kemudian agarose dilarutkan dalam 100 mL TBE di dalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam pemanasan gel (sop microwave[®]) selama 1-2 menit hingga larut dan diperoleh larutan jernih, lalu dituangkan pada cetakan gel yang telah dipasang sisir pembuat sumur sampel dan biarkan gel mengeras di suhu ruangan. Setelah mengeras, angkat sisir sehingga terbentuk sumur, kemudian masukkan gel ke dalam alat elektroforesis dan tuangkan TBE sampai gel terendam, 5 µL templat DNA hasil amplifikasi ditambah gel red 5 µL ke dalam sumur gel agarose, dan untuk campuran leader 1 µL *loading die* + 3 µL leader + 5 µL red. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1,5% dan menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit dengan untaian DNA 16s rRNA: 1500 bp.

D. Sekuensing DNA dan BLAST

Analisis sekuensing dilakukan di laboratorium 1st Base (Singapore). Sampel yang di sekuensing kemudian di BLAST untuk melihat urutan nukleotida dari hasil sekuensing dengan data base yang tersedia pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov/ yang digunakan untuk mencari similaritas suatu sekuen nukleotida atau protein (*query sequence*) dengan sekuens data base (*subject sequence*).

DAFTAR PUSTAKA

- A. Good Man, G. (2012). *Dasar Farmakologi Terapi, Edisi 10*. Jakarta: EGC.
- A. Yuda Handaya, S.-K. (2016). *Tepat dan Jitu: Atasi Ulkus Diabetes*. Yogyakarta: Rapha Publishing.
- Agni Hajma, L. P., 2016. *Evaluasi Penggunaan Antibiotik Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 3 Dengan Komplikasi Ulkus/Gangren Di Instralasi Rawat Inap RSUD Dr Moewardi Surakarta Tahun 2015*. (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta.
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan gen 16s rRNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmacon*, 9(1), 16-22.
- Alavi, A., Bader, M. S. and Sibbald, R. G., 2014. Management of diabetic foot infections eith appropriate use of antimicrobial therapy. *Clinical Research on Foot and Ankle*, 3(10), pp. 1-10.
- Amstrong DG, Lavery AL. *Diabetic foot ulcer: prevention, diagnosis and classification*. Am Fam Physician. 1998;5(6):1325-32.
- Anonim, 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Astuti RT. Faktor Ulkus Diabetika Pada Penderita Diabetes Melitus (Studi Kasus di RSUD Dr. Moewardi Surakarta). [Tesis]. Surakarta: Universistas Diponegoro; 2008.
- Aztal Z, Sharif FA, Abdallah SA, Fahd MI. *Extended sectrum beta lactamase in Eschericia coli isolated from community acquired urinary tract infection in the Gaza Strip, Palestina*. Ann Saudi Med 2004;24: 55-7.
- Bandyk, D. F. (2018). The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Seminar in Vascular Surgery*, 31(2-4), 43-48. <https://doi.org/10,1053/j.semvascsurg.2019.02.001>.
- Boike AM, Hall JO. A practical guide for examining and treating the diabetic foot. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2002;69(4):342-8.
- Bowering CCK. *Diabetic foot ulcers patophysiology, assessment and therapy*. Canadian Family Phycisian. 2001;47:1007-16.
- Bowering, K & Embil, J. M., 2013. Foot Care. *Can J Diabetes*, 37(1), pp. S145-S149.

- Bradford, P., 2001. Extended-Spectrum β -lactamase in 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Treat. *Clinical Microbiology Review*, 14(4):933-951.
- Brander et al., (1991). *Vetirinary Applied Pharmacology and Theraeutics* 5thed. The English Book Society Belliare Tindal. London Pp. 416-450.
- Budi Utomo, S., Fujiyanti, M., Puji Lestari, W., dan Mulyani, Sri. “Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilikalik[4]Resorsinarena Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium-Bromide Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*”. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia* 03, no.3 (2018):201-209.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). *Update Functional Classification of Beta Lactamases*. 54(3), 969-967. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Chaudary U, Aggarwal R. *Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)*, an emerging threat to clinical therapeutic. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2004;22(2):75-80.
- Chen, P., Callisaya, M., Wills, K., Greenaway, T., & Winzenberg, T. (2019). *Associations of health literacy with risk factors for diabetic foot disease: a cross-sectional analysis of the Southern Tasmanian Health Literacy and Foot Ulcer Development in Diabetes Mellitus Study*. 1-10. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-025349>.
- Clayton W, Elasi TA. A review of pathophysiology, classification and treatment of foot ulcers in diabetic patiens. *Clinical Diabetes*. 2009;27(2):52-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2017. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 27th Ed*. CLSI Supplement M100, Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cuestavargas, A. I. (2019). *Prevention, assesment, diagnosis and management of diabetic foot based on clinical practice guidelines*.
- Darmadi. 2008. *Infeksi nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Medika. 123-126.
- Darmo Handoyo, A. R. (2001). *Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]*. Surabaya: Pusat Studi Bioteknologi – Universitas Surabaya.
- Decroli E, Karimi J, Manaf A, Syahbdin S. Profil Ulkus Diabetikum pada Penderita Rawat Inap di Bagian penyakit Dalam RSUP Dr. M Djamil

- Padang. *Bagian Ilmu Penyakit dalam Fakultas Kedokteran Unand Padang*; Majalah Kedokteran Indonesia. 2008; Vol 58.
- Edmonds, M. E., Foster, A. V., & Sanders, L. J. (2008). *A Practical Manual Of Diabetic Foot Care*. UK: Blackwell Publishing.
- Effendi, Yunus. 2018. *Modul Petunjuk Praktikum Mk Dasar Bioinformatika*. Jakarta: FST Universitas Al Azhar Indonesia.
- Fatisa, Y. (2013). (Nephelium mutabile) Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli SECARA IN VITRO. *Jurnal Peternakan*, 10(1), 31–38.
- Fattah Hamid S., Bahadeen Taha A., Jamel Abdulwahid M. Distribution of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA, and blaDHA in Proteus mirabilis Isolated from Diabetic Foot Infections in Erbil, Iraq. *Cell Mol (Noisy-le-grand)*. 2020 Apr 20;66(1):88-94. PMID: 32359390.
- Forbes BA, Weissfeld AS, S. D. (2007). *Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 187-213.
- Frykberg RG, Amstrong DG, Giurini JM, Zgonis T, Driver VR, Kravitz SR, et al. Diabetic foot disorders a clinical practice guidelines. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 2000;35(5):S2-59.
- Frykberg, R. G., Zgonis, T., Armstrong, D. G., Driver, V.R., Guirini, J. M., Kravitz, S. R., Vanore, J. V. (2006). Diabetic Foot Disorders: A Clinical Practice Guideline (2006 revision). *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 45 (5 SUPPL.), 1-66. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(07\)60001-5](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(07)60001-5).
- Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. (4 ed.). Washington, DC: ASM Press. Hlm. 117– 118.
- Gran, H. F. S. 1983. *Antimikrobal Dalam Sulistis Gan dan Terapi*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Indonesia. Jakarta.
- Hafsan, S. & Masri, 2015. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Makassar. Universitas Islam Negeri.
- Harley, P. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology (5th ed.)*. New York: McGraw-Hill Companies.
- Herdissa, Widya Yolanda. 2020. *Identifikasi Bakteri Penghasil Extended Spectrum b Lactamase (ESBL) dengan Metode DDST Pada Pus pAsien Ulkus Diabetikum Ynag Di Rawat Inap Di Bangsal Interne RSUP Dr. M. Djamil Padang*. (Skripsi). Universitas Perintis Indonesia: Padang.
- Innis, M.A.(Eds.). 1990. *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. California: Academic Press, Inc.

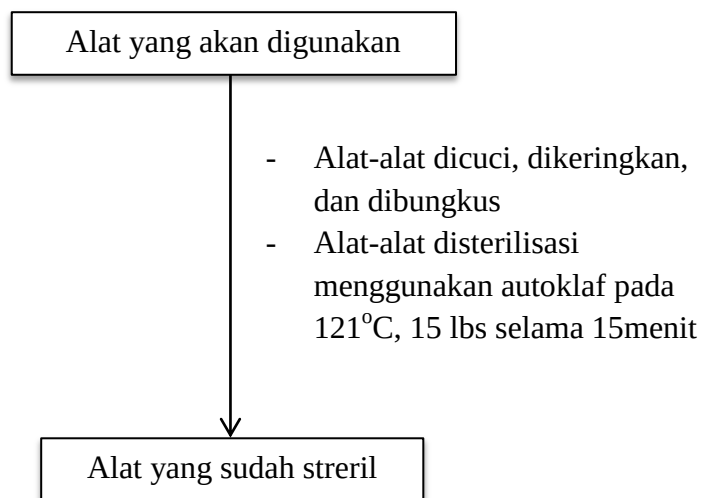
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. (2001). *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi XXII.
- Jawetz, M. (2010). *Mikrobiologi Kedokteran* (23rd ed.). penerbit Buku Kedokteran: EGC.
- Jawetz. 2005. *Mirobiologi Kedokteran*. Selemba Medika: Jakarta.
- Julia Garamina, H., & Wulan Sumekar, D. (2017). Analisis Perbandingan Uji Sensitivitas Antibiotik dan Keberadaan *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL) pada *Escherichia coli* dari Feses Tenaga Medis di Ruang Rawat Inap Dewasa dan Ruang Rawat Inap Anak Comparative Analysis of Antibiotic Sensitivity Te. *Artikel Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung*, 4. 275-282.
- Kaur, M and Aggarwal, A. 2013. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India. *Journal Clin Diagn Res*. 7(4) : 642–645.
- Kurniawan, Fajar, Bakti., Indra, Taufik, Sahli., 2018. *Bakteriologi*. Jakarta: EGC.
- Levan A, Jacob D. Gram Stain: Gram-negative rods. ASM MicrobeLibrary.org ed. Gram negative 2010.
- Lim, J. Z. M., Ng, N. S. L., & Thomas, C. (2017). Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 110(3), 104-109. <https://doi.org/10.1177/0141076816688346>.
- Lipsky, B., A., Berendt A., R., Cornia ., B., Pile, J., C., Peters, E., J., G., dan Armstrong, D., G. 2012. Infection Diseases Society of America Clinical Proctice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 54(12): 132-173.
- Lipsky, Benjamin A. (2012). *Infection Diseases Society of America Clinical Practice Guildeline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections*. Washington: Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America 2012.
- Lisky, B. A. et al., 2012. 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline. *IDSA Guidelines*, pp. 132-147.
- Mardia, A., I. 2015. Penelitian Akurasi Italian Score Sebagai Prediktor Infeksi Extended-Spectrum Beta Lactamase (ESBL). *Tesis*. Medan: Dapartemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Mardiyanoro, Ferdy., Dkk., 2018. *Penyembuhan Luka Rongga Mulut*. Penerbit: UB Press.

- Mariam, T. G., Alemayehu, A., Tesfaye, E., Mequannt, W., Temesgen, K., Yetwale, F., & limenih, M. A. (2017). Prevalence of Diabetic Foot Ulcer and Associated Factors among Adult Diabetic Patients Who Attend the Diabetic Follow-Up Clinic at the University of Gondar Referral Hospital, North West Ethiopia, 2016: Institutional-Based Cross-Sectional Study. *Journal of Diabetic Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2879249>.
- Maryati, R. S. Fauzia, dan T. Rahayu. 2007. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal penelitian Sains dan Teknologi* Vol.8(1):30-38.
- Masriadi, S. S. (2018). *SURVEILANS*. Jakarta Timur: CV. Trans Info Media.
- McPhee, S. J., dan Ganong, W. F. 2010. *Patofisiologi Penyakit Pengantar Menuju Kedokteran Klinis, Edisi 5*. Jakarta: EGC.
- Munfaati, P. N., Evie, R., Guntur, M. (2014). *Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (Phyllanthus niruri) terhadap Pertumbuhan Bakteri Shigella dysenteriae Secara in Vitro*.
- Munro N, Rich N, McIntosh C, Foster AVM, Edmonds ME. Infections in the diabetic foot: a practical management guide to foot care. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. 2003;3:132-6.
- Neu HC, Gootz TD. 2001. *Antimicrobial Chemotherapy*. Medmicro.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Noor, S., Zubair, M., & Ahmad, J. (2015). *Acceptance of Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2015.04007>.
- Novelni, Ringga., Irwandi., & Pratiwi, Diani. Identifikasi Dan Uji Resistensi Bakteri Pada Pasien Ulkus Diabetikum Di Bangsal Interne RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia* 8, no. 2 (2019): 67.
- Nur, A., dan Marissa, N. (2016). *Gambaran Bakteri Ulkus Diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Merauxa Tahun 2015*. 44.
- Patil, Y., Khadse, R., Chavan, S., dan Raut, S. 2018. Bacteriological Profil of Diabetic Foot Infections. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 5(6): 631-635.
- Pelczar, MJ., Chan ECS., 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

- Perezfavila, A., Martinez-fierro, M. L., Rodriguez-lazalde, J. G., Mollinedo-montano, F.E., Rodriguez-sanchez, I. I., & Castaneda-miranda, R. (2019). *Current Therapeutic Strategies in Diabetic Foot Ulcers*. 1-21.
- PERKENI. *Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia; 2011.
- Peterson DL, Bronomo RA. Extended Spectrum Beta Lactamase: clinical update. *Clin Mycribiol Rev*. 2005; 18(4): 657-86.
- Pitocco, D., Spanu, T., Di Leo, M., Vitiello, R., Rizzi, A., Tartaglione, L., Fiori, B., Caputo, S., Tinelli, G., Zaccardi, F., Flex, A., Galli, M., Pontecorvi, A., & Sanguinetti, M. (2019). *Diabetic foot infections: a comprehensive overview. European review for Medical and Phamacological Sciences*, 23(2), 26-27. https://doi.org/10.26355/eurev_201904_17471.
- Putri N., Isfandari M. Hubungan Empat Pilar Pengendalian DM Tipe 2 dengan Rerata Kadar Gula Darah. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 1 (2). 2013: 234-43.
- R. Setiabudy dan Vincent H. S. Gan. 1995. Antimikroba Dalam: *Farmakologi Dan Terapi*, edisi 4. Jakarta: Gaya Baru. Halman 571-3.
- Rang, H. P., Dale, M. M. & Ritter, J. M., 2012. *Rang & Dale's Pharmacology*. 7th penyunt. London: Elsevier Inc.
- Rogers K. 2011. *New Thinking about Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing, Hlm. 132.
- Roza, R. L., Afriant, R., & Edward, Z. (2015). Faktor Risiko Terjadinya Ulkus Diabetikum pada Pasien Diabetes Mellitus yang Dirawat Jalan dan Inap di RSUP. Dr. M. Djamil dan RSI Ibnu Sina Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(1), 243-248. <https://doi.org/10.25077/jka.v4il.229>.
- Rupp, M. E., Fey, P. D., 2003. Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *Drugs*, 63(4): 353-365.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari, Y. O., Almasdy, D., & Fatimah, A. (2018). Evaluasi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Ulkus Diabetikum di Instalasi Rawat Inap (IRNA) Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. *JSFK (Jurnal Sains Farmasi & Klinis)*, 5(2), 102-111. <https://doi.org/10.25077/JSFK.5.2.102-111.2018>
- Shaikh, Sibhghatulla., Fatima, Jamale., Shakil, Shazi., A, Syed Mohd. Danish Rizvi., and Kamal, Mohammad Amjad. 2015. Antibiotic Resistance and Extende Spectrum Betalactamases: Types, Epydemiology and Treatment. *Saudi Journal of biological Science*. Availabel from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

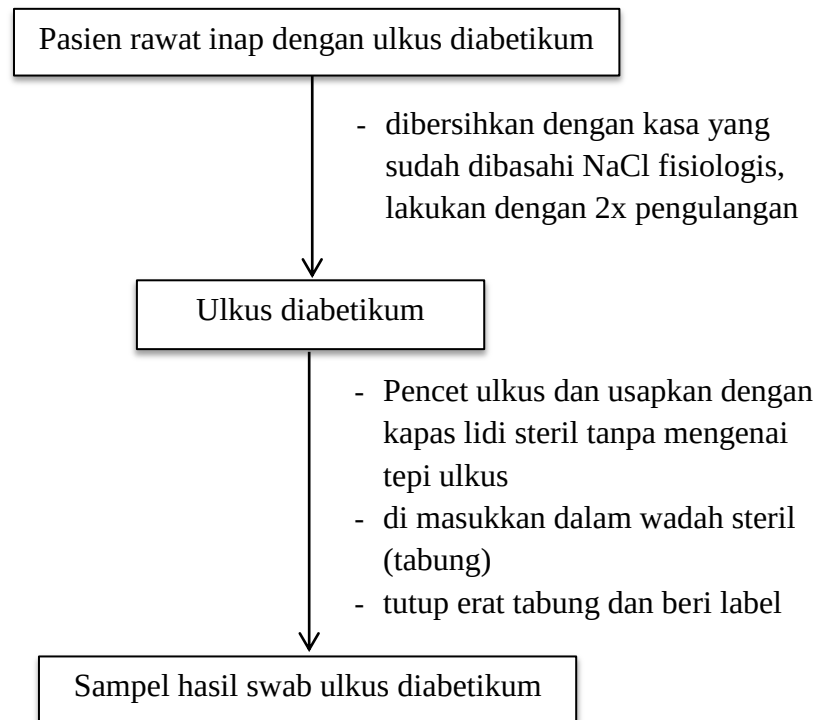
- Sharma J, Meera S, Palap R. 2009. Detection of TEM and SHV in Escherichia Coli and Klabisella Pneumonia Isolates in a Tertiary Care Hospital from India. *Indian Journal Med Res.* 132: 332-336.
- Sugiyono. (2011). *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Suhartati, R., dan Faidah, E. N. (2014). Identifikasi Bakteri Oxacillin Resistant Staphylococcus Aureus (Orsa) Pada Ulkus Penderita Diabetes Mellitus Di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Umum Daerah (Rsud) Tasikmalaya. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* 11 (1): 161-167.
- Suryati, I., Primal, D., & Pordianti, D. (2019). Hubungan Tingkat Pengetahuan Dan Lama Menderita Diabetes Mellitus (DM) Dengan Kejadian Ulkus Diabetikum Pada Pasien DM Tipe 2. *Jurnal Kesehatan Perintis (Perintis's Health Journal)*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.33653/jkp.v6il.214>.
- Taufiqqurohman. (2015). Indonesian bay Leaves As Antidiabetic for Type 2 Diabetes melitus. *J Majority*, 4(3), 104.
- Trisna, P. A., 2010. *Polimorfisme Ercherichia coli Penghasil Extrended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) Pada pemotongan Dengan Enzim Restriksi EcoRI. (Skripsi)*. Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
- Wahyu, L. 2005. *Mikrobiologi Lingkungan*. Universitas Muhammadiyah: Malang.
- Warganegara, E., & Apriliana, E. (2014). The Determining type of Extended Spectrum Beta Lactamase Enzyme (ESBL) from Escherichia coli resistance Chephalosporine of third Generation in RSUD Abdoel Moeloek Bandar Lampung. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 4(7), 87-96.
- Waspadji S. Kaki diabetes. Dalam: Sudayo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata MK, Setiati S, editor. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam (Edisi V Jilid III)*. Jakarta: Internal Publishing, 2009; p 1961-7.
- WHO (World Health Organization). (2014). *Diabetes Melitus*.
- Williams, C., Williamson, R., Coulettr, C., Loeffler, F., Smith, J., and Ivinson, A. (1988). *Lancet*, i, 102.
- Yunir, Soebardi. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Ed. 4*. Jakarta: Balai Penerbit FKU.
- Yusuf K. Zuhriana. "Polymerase Chain Reaction (PCR)." UNG REPOSITORY 05, no. 6 (2010):1-4.

Lampiran 1. Skema Kerja Sterilisasi Alat



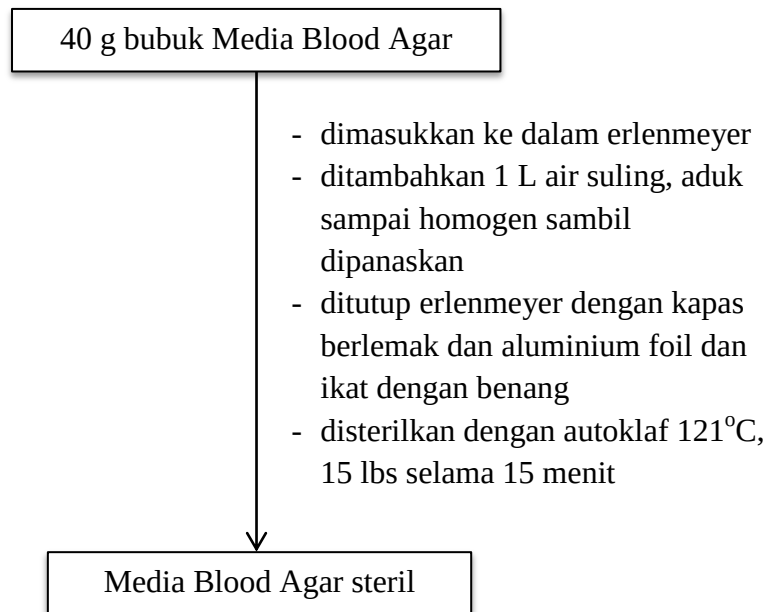
Gambar 5. Skema Kerja Sterilisasi Alat

Lampiran 2. Skema Kerja Pengambilan Sampel



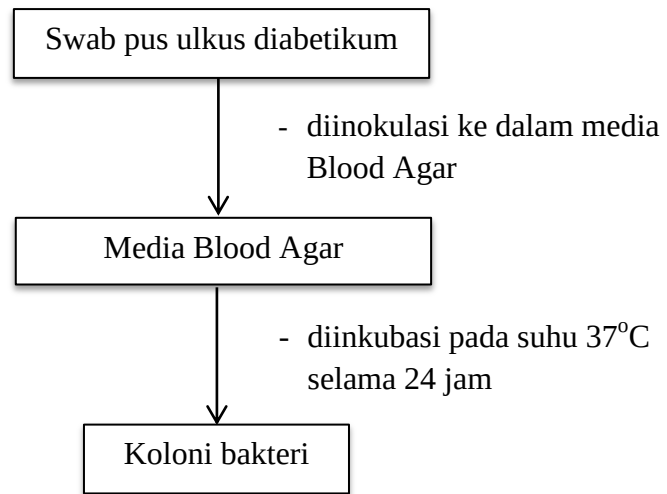
Gambar 6. Skema Kerja Pengambilan Sampel

Lampiran 3. Skema Kerja Pembuatan Media Spesifik



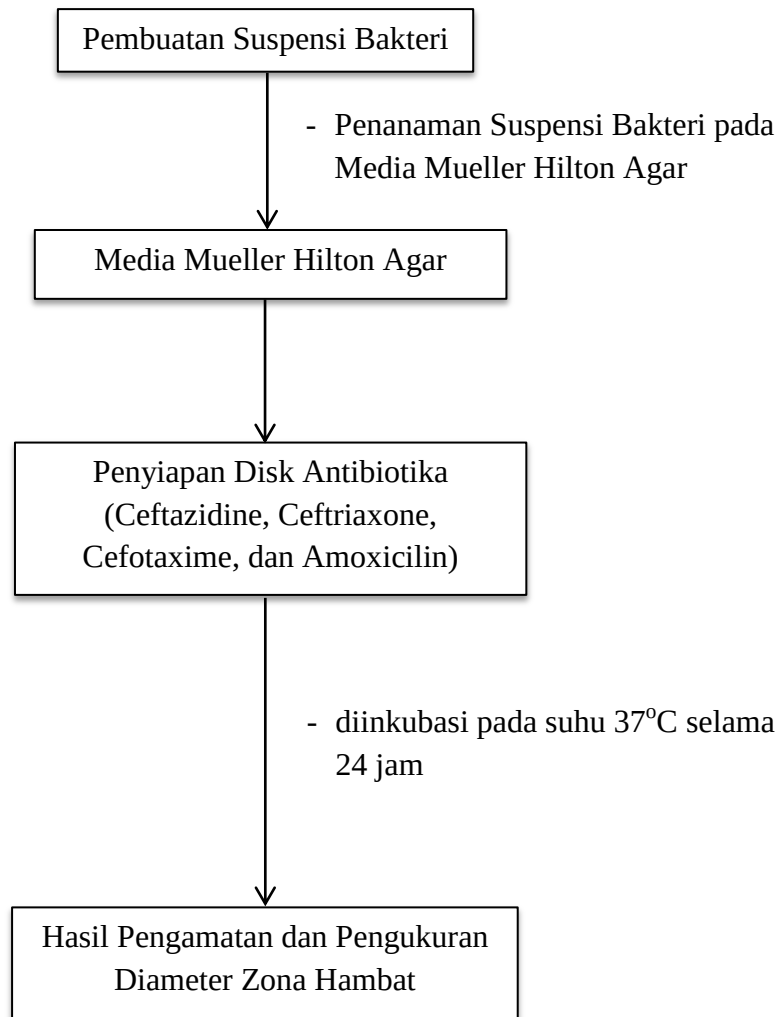
Gambar 7. Skema Kerja Pembuatan Media Spesifik

Lampiran 4. Skema Kerja Isolasi Bakteri



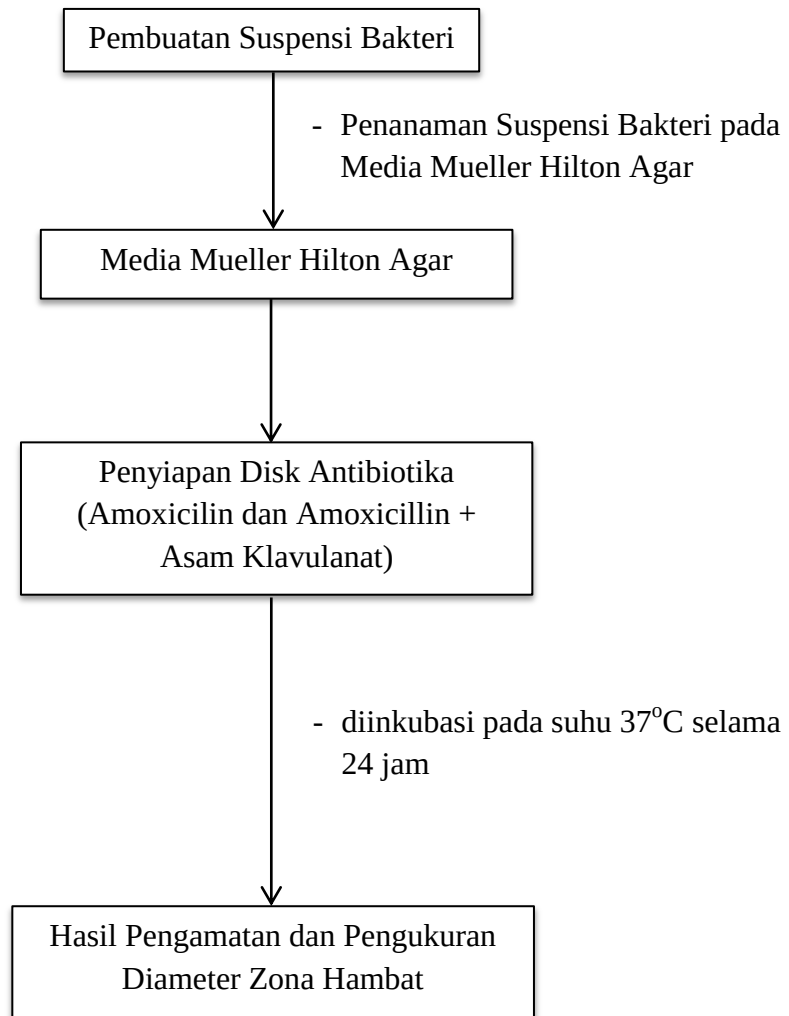
Gambar 8. Skema Kerja Isolasi Bakteri

Lampiran 5. Skema Kerja Uji Skrining ESBL



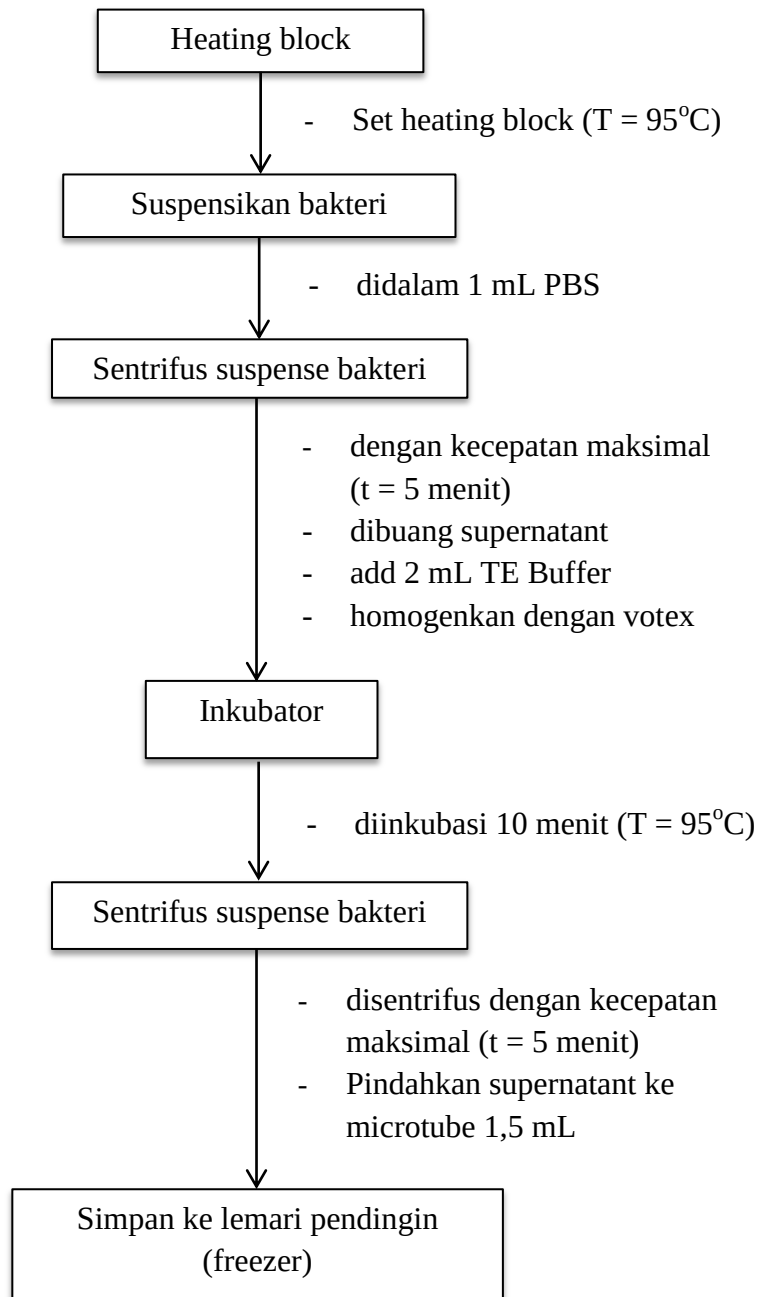
Gambar 9. Skema Kerja Uji Skrining ESBL

Lampiran 6. Skema Kerja Uji Fenotip ESBL



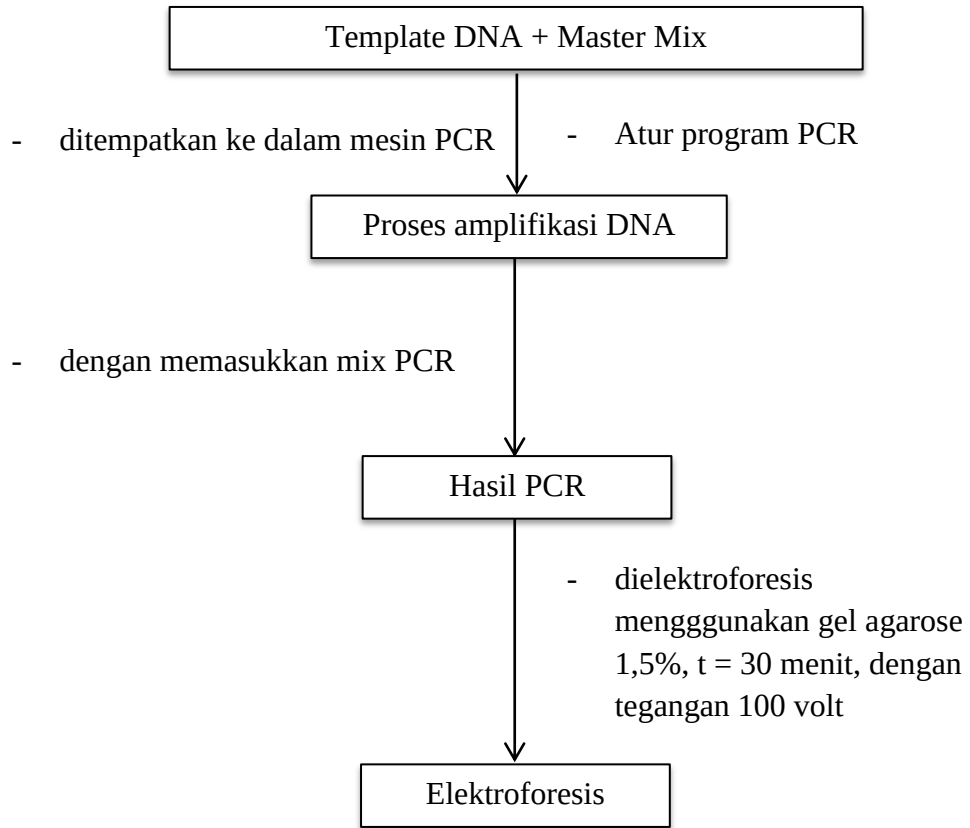
Gambar 10. Skema Kerja Uji Fenotip ESBL

Lampiran 7. Skema Kerja Isolasi DNA



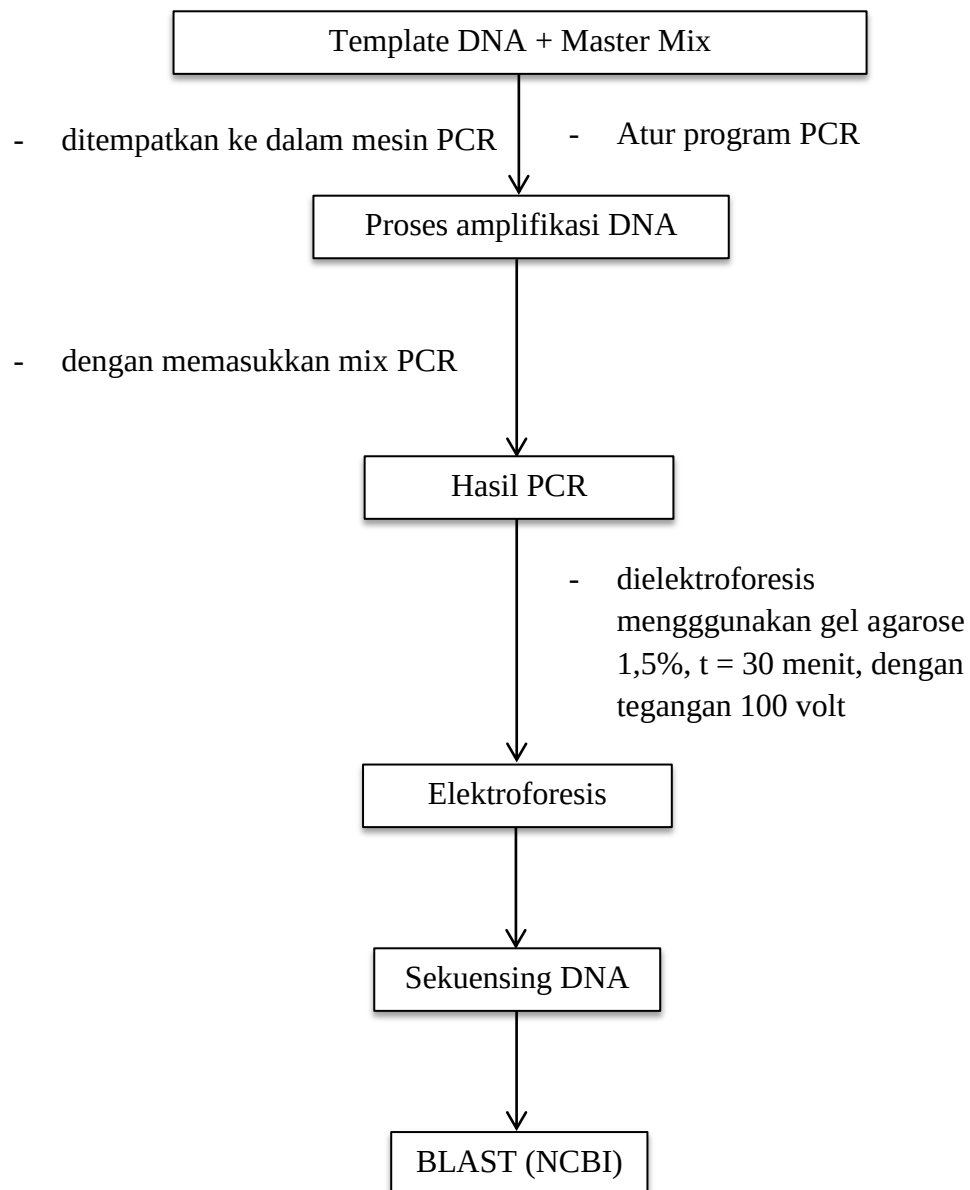
Gambar 11. Skema Kerja Isolasi DNA

Lampiran 8. Skema Kerja Identifikasi Gen (CTX-M, TEM dan SHV) Pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum



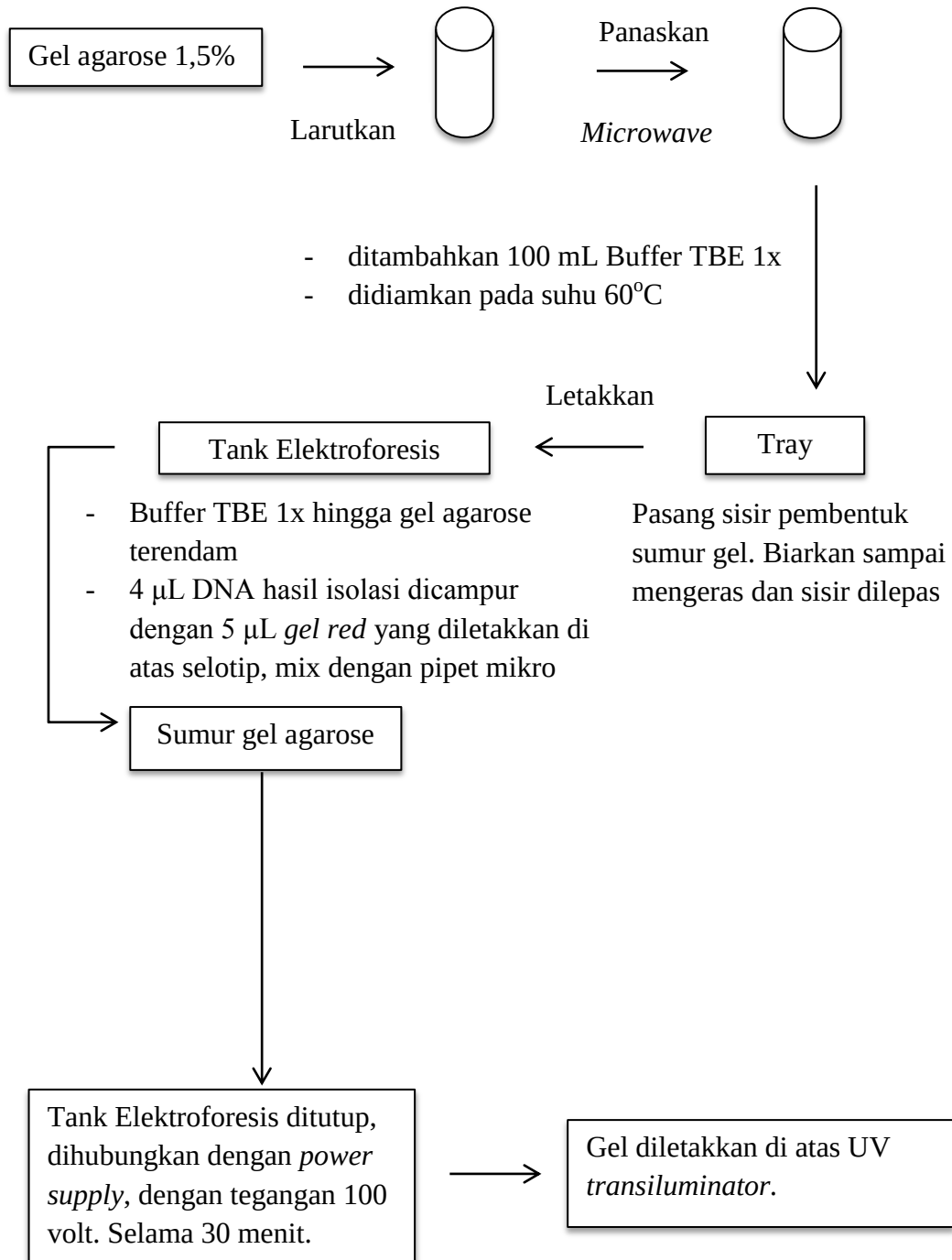
Gambar 12. Skema Kerja Identifikasi Gen (CTX-M, TEM dan SHV) Pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum

Lampiran 9. Skema Kerja Identifikasi Spesies Bakteri ESBL Pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum



Gambar 13. Skema Kerja Identifikasi Spesies Bakteri ESBL Pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum

Lampiran 10. Skema Kerja Proses Elektroforesis



Gambar 14. Skema Kerja Proses Elektroforesis