

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Pendekatan Penelitian

Penelitian dilakukan secara observasional-analitik dengan pendekatan Cross Sectional. Pada pendekatan 'Cross Sectional', dilakukan pengumpulan sampel limbah cair dari tempat penelitian yakni ruang rawat inap Bedah Urologi dan ruang rawat inap Kedokteran Jiwa RSUD Dr Soetomo Surabaya. Pada waktu bersamaan, dilakukan pemisahan *Escherichia coli* dari sampel-sampel tersebut. Selanjutnya dari bakteri yang telah dipisahkan tersebut, dilakukan uji kepekaan terhadap ampisilin. Maka akan diperoleh hasil *Escherichia coli* dari kedua tempat yang kebal atau peka terhadap ampisilin.

Pada bakteri yang telah diketahui kebal terhadap ampisilin, dilakukan uji transformasi pada bakteri acuan (*Escherichia coli* kompeten dari galur DH5alfa). Selanjutnya pada hasil transformasi positif dilakukan analisis lebih lanjut terhadap sifat plasmid.

4.2 Tempat Penelitian dan Pengambilan Sampel

4.2.1 Tempat penelitian

Sebagai tempat penelitian dipilih ruang rawat inap pada UPF Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Sebagai kontrol untuk tempat dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah, dipilih ruang rawat inap pada UPF Kedokteran Jiwa RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

4.2.2 Pengambilan sampel penelitian

Sampel penelitian adalah limbah cair buangan sepanjang saluran yang berasal dari kamar mandi yang diambil dari 'lingkungan1' (UPF BU) dan lingkungan2 (UPF IKJ). Hal ini karena kamar mandi merupakan tempat utama penderita membuang air kemih, sedangkan 30-40% ampisilin yang diminum penderita dikeluarkan melalui air kemih dalam bentuk aktif. Karena itu, diharapkan paparan antimikroba ampisilin terhadap flora lingkungan, khususnya *Escherichia coli* pada limbah cair buangan kamar mandi akan tinggi. Disamping hal diatas, adanya kolonisasi bakteri lingkungan pada tubuh penderita akan terbilas saat mandi dan terbang ke saluran pembuangan limbah kamar mandi.

4.3 Tingkat Penggunaan Antimikroba di Lokasi Penelitian

Tingkat pengaruh antimikroba didasarkan pada dua hal yakni: 1). berapa persen penderita rawat inap di lokasi penelitian yang mendapat pengobatan ampisilin ; 2). berapa dosis rata-rata ampisilin (dalam miligram) per penderita. Pencatatan penggunaan antimikroba dilakukan setiap hari selama tiga bulan, dengan cara mencatat setiap antimikroba yang diberikan pada penderita dan tercatat dalam buku penderita rawat inap.

Perbedaan pengaruh dianalisis secara statistik dengan uji khi kuadrat untuk ad. 1) dan uji t bebas untuk ad. 2). Pengaruh antimikroba dikatakan lebih tinggi jika dua parameter di atas lebih besar.



4.4 Populasi, Sampel Penelitian dan Besar Sampel

4.4.1 Populasi

Sebagai populasi target adalah flora *Escherichia coli* yang ada di lingkungan penelitian. Sedangkan populasi sampel adalah *Escherichia coli* yang dipisahkan dari limbah cair buangan kamar mandi di lokasi penelitian.

Sampel limbah diambil sebanyak 2 sampai 3 kali setiap minggu, dengan jumlah 3 sampai 4 sampel tiap pengambilan. Dari setiap sampel, dibiakkan di laboratorium dan dipisahkan bakteri *Escherichia coli*, sehingga akan terkumpul *Escherichia coli* sejumlah yang disyaratkan pada perhitungan jumlah sampel (butir 4.4.2.3).

4.4.2 Sampel penelitian

4.4.2.1 Unit analisis

Sebagai unit analisis pada penelitian tersebut adalah flora *Escherichia coli* yang dipisahkan dari sampel yang diambil dari lingkungan penelitian.

Escherichia coli dipakai sebagai petunjuk paparan terhadap berbagai antimikroba karena beberapa alasan yakni:

- a. Flora normal dari golongan koliform pada manusia, selalu dijumpai adanya *Escherichia coli*.
- b. *Escherichia coli* mempunyai habitat utama dalam usus manusia dan hewan, juga pada permukaan tubuh terutama sekitar anus. Bakteri ini juga banyak ditemukan pada lingkungan sekitar manusia, termasuk limbah cair di lingkungan sekitarnya.
- c. *Escherichia coli* mempunyai daya tahan hidup yang relatif tinggi pada berbagai tempat, termasuk lingkungan sekitar.

- d. Berkaitan dengan keberadaan *Escherichia coli* dalam usus manusia, permukaan luar (kulit) tubuh manusia maupun pada lingkungan atau limbah sekitar, maka setiap konsumsi antimikroba oleh seseorang, hampir selalu terjadi juga paparan antimikroba dengan flora *Escherichia coli*.
- e. Selain sebagai flora normal, ternyata *Escherichia coli* sering juga menjadi penyebab penyakit infeksi pada manusia, baik infeksi nosokomial maupun infeksi bukan nosokomial.
- f. Telah banyak ditemukan adanya plasmid kekebalan berada dalam bakteri *Escherichia coli*.

4.4.2.2 Cara pengambilan sampel

Sampel diambil dengan menggunakan semprit steril isi 5 mililiter, diambil sebanyak 5 ml sampel limbah cair di beberapa tempat berbeda di saluran buangan kamar mandi. Sampel langsung dibawa ke Laboratorium Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikrobiologis. Sampel dikumpulkan secara bergantian antara kedua lokasi penelitian. Pada setiap sampel limbah diambil sebanyak 3 galur *Escherichia coli* sampai diperoleh sejumlah sampel yang disyaratkan

4.4.2.3 Besar sampel penelitian

Penelitian tersebut adalah membandingkan proporsi kekebalan *Escherichia coli* antara dua tempat. Maka dapat menggunakan rumus 4.1. (Snedecor & Cochran, 1980). Berdasar rumus 4.1, perlu diketahui perkiraan proporsi kekebalan *Escherichia coli* di kedua lokasi penelitian (p_1 dan p_2).

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

Rumus 4.1

Rumus cara menghitung besar sampel (n) untuk uji banding proporsi dua kelompok.

Keterangan: n = besar sampel tiap perlakuan; Z = Indeks Standard penyimpangan

α = tingkat kesalahan; β = kuat uji ('Power')

p1= proporsi kekebalan di tempat penelitian-1

p2= proporsi kekebalan di tempat penelitian-2

q1= 1-p1 q2 = 1 - p2

Penelitian tersebut menggunakan tingkat kesalahan 5% satu ekor dengan kuat uji 90%. Maka angka $(Z\alpha + Z\beta)^2 = 8,6$. Hal ini dapat dilihat Tabel 4.1.

Pada penelitian pendahuluan tentang adanya plasmid pengkode kebal ampisilin pada *Escherichia coli* dari isolat yang berasal UPF IKJ dan UPF BU, telah dilakukan pada 12 sampel limbah cair rumah sakit dari masing-masing lokasi penelitian. Dari 12 sampel telah dipisahkan 3 sampel tiap sampel sehingga terkumpul sebanyak 36 *Escherichia coli* pada tiap lokasi penelitian. Pada pemeriksaan kekebalan terhadap ampisilin cara pengenceran agar, diperoleh hasil 30 galur *Escherichia coli* dari UPF IKJ kebal ampisilin dan dari UPF BU didapatkan 32 galur kebal ampisilin. Pada uji transformasi dari isolat plasmid dari masing-masing bakteri kebal ampisilin, 7 galur dari 30 galur kebal ampisilin yang berasal dari UPF IKJ diketahui mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin. Sedangkan 12 galur *Escherichia coli* dari 32 galur kebal ampisilin yang berasal dari UPF BU, mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin. Jika angka kejadian plasmid tersebut dihitung dari jumlah total isolat *Escherichia coli* dari kedua lokasi penelitian, maka

19,44% isolat *Escherichia coli* dari UPF IKJ mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin, sedangkan dari UPF BU ada 33,33%. Berdasar hasil ini maka jumlah sampel penelitian dapat dihitung menggunakan rumus 4.1., sehingga $n = 168,86$. Berdasar pemikiran ini peneliti mengambil sampel limbah cair rumah sakit sebanyak 70 sampel dari masing-masing lokasi, dan setiap sampel dipisahkan sebanyak 3 galur *Escherichia coli*, sehingga jumlah total sampel adalah 210 galur *Escherichia coli*.

Tabel 4.1

Angka pengali ('Multiplier') dari pada σ^2/δ^2 untuk sampel berpasangan, dan $2\sigma^2/\delta^2$ pada sampel bebas, yang dibutuhkan untuk menentukan besar masing-masing sampel.

Kuat uji (Power)	Tingkat kemaknaan (Dua ekor)			Tingkat kemaknaan (Satu ekor)		
	1%	5%	10%	1%	5%	10%
80%	11,7	7,9	6,2	10	6,2	4,5
90%	14,9	10,5	8,6	13	8,6	6,6
95%	17,8	13	10,8	15,8	10,8	8,6

Keterangan: $2\sigma^2 = (p1.q1 + p2.q2)$ pada rumus 4.1.

Angka pengali = $(Z\alpha + Z\beta)^2$ pada rumus 4.1.

4.5 Tempat Pemeriksaan

Pemeriksaan mikrobiologis dan uji kepekaan, serta pemisahan plasmid pengkode kebal ampisilin, dilakukan di Laboratorium TDC Universitas Airlangga dan dengan bantuan Laboratorium Biokimia, Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4.6 Pemeriksaan Mikrobiologis

Pemisahan dan pemeriksaan *Escherichia coli* menurut cara (Baron *et al.*, 1994; Munro, 1992). Tiap sampel ditanam pada media *Eosin Methylen Blue* (EMB), setelah dieramkan 37 °C suasana aerobik selama 18 jam, diambil 5 koloni yang berbentuk bulat ukuran sekitar 1-2 milimeter, serta bersifat laktosa positif dan berwarna kilap logam. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kepastian dengan uji TSI ('*Triple Sugar Iron*'); IMViC (Indol, Metil merah, Voges-Proskauer, Penggunaan sitrat); uji urease dan motilitas, sampai terdiagnosis spesies *Escherichia coli*. Tata cara pemeriksaan aglutinasi, biokimiawi dan motilitas dapat dilihat pada Lampiran 2. Spesies *Escherichia coli* ditegakkan berdasar hasil berikut ini: TSI (Slant: Asam; Butt: asam, ada gas, tidak ada H₂S); Indol (positif); MR (positif); VP (negatif); Pemakaian sitrat (negatif); motilitas (positif); produksi urease (negatif) dan aglutinasi (positif). Penjelasan hasil positif dan negatif ada di Lampiran 2. Untuk kepastian diagnosis, dilakukan dengan uji aglutinasi menggunakan antisera polivalen terhadap *Escherichia coli*. Dipergunakan antisera buatan BioFarma Bandung. Pemeriksaan dilanjutkan dengan uji kepekaan terhadap ampisilin, menurut cara baku dari NCCLS dengan modifikasi ('*National Committee for Clinical Laboratory Standard*') (Baron *et al.*, 1994; Sahm and Washington, 1991). Tiap sampel limbah dipisahkan 3 galur *Escherichia coli* sebagai unit analisis.

4.7 Uji Kepekaan Cara Pengenceran Agar

Cara ini dipilih karena pada uji-uji selanjutnya, misalnya pada uji seleksi kepindahan kekebalan, dilakukan pada media agar yang mengandung antimikroba yang diuji.

Antimikroba uji dipersiapkan dalam bentuk larutan simpanan (*'Stock solution'*) dengan kadar 64 miligram per mililiter akuades.

Sebagai media uji adalah media agar MH (*'Mueller Hinton'*) yang dibuat menurut petunjuk pabrik. Antimikroba ditambahkan saat agar masih cair, sebelum dituang ke lempeng petri. Tiap lempeng petri diisi 20 ml agar MH (Sahm and Washington II, 1991). Kadar antimikroba yang dipakai sebagai petunjuk kekebalan pada uji tersebut adalah 16 mikrogram per ml ampisilin. Hal ini sesuai dengan batas kadar bunuh minimal yang disepakati. Bakteri dikatakan kebal jika tumbuh pada media yang mengandung ampisilin kadar 16 mikrogram per mililiter atau lebih. Cara ini seperti juga yang dilakukan Tullus et al (1990) untuk menentukan kekebalan *Escherichia coli* flora tinja neonatus.

Persiapan inokulum dilakukan dengan membiakkan bakteri sampel pada media cair Mueller Hinton, dieramkan suhu 37 C semalam. Selanjutnya diencerkan dengan garam faali (NaCl 0,85%) sampai kekeruhan setara dengan standard McFarland 0,5 yang berarti mengandung bakteri sebanyak 10^8 per mililiter. Selanjutnya diencerkan lagi 10 kali. Sebagai inokulum adalah sebanyak 2 mikroliter suspensi bakteri.

Sebagai kontrol kualitas dipergunakan *Escherichia coli* galur ATCC25922. Metode dianggap tepat dan baik jika dengan cara yang sama, diperoleh KHM (Kadar Hambat Minimal) terhadap ampisilin adalah 2-8 mikrogram per ml. Hal ini sesuai dengan ketentuan *NCCLS* (Sahm and Washington II, 1991).

4.8 Pemeriksaan Kekebalan Dikode Plasmid

4.8.1 Isolasi plasmid dari *Escherichia coli* sampel

Untuk melakukan transformasi, plasmid harus dipisahkan dahulu dari sel bakteri, dengan cara menghancurkan sel bakteri. Dipergunakan cara alkali ('Lysis by Alkali') (Sambrook *et al.*, 1989). Prinsip cara ini ada dua tahap yakni: 1). Persiapan biakan bakteri; 2). penghancuran bakteri dengan cara kimiawi untuk memisahkan plasmid.

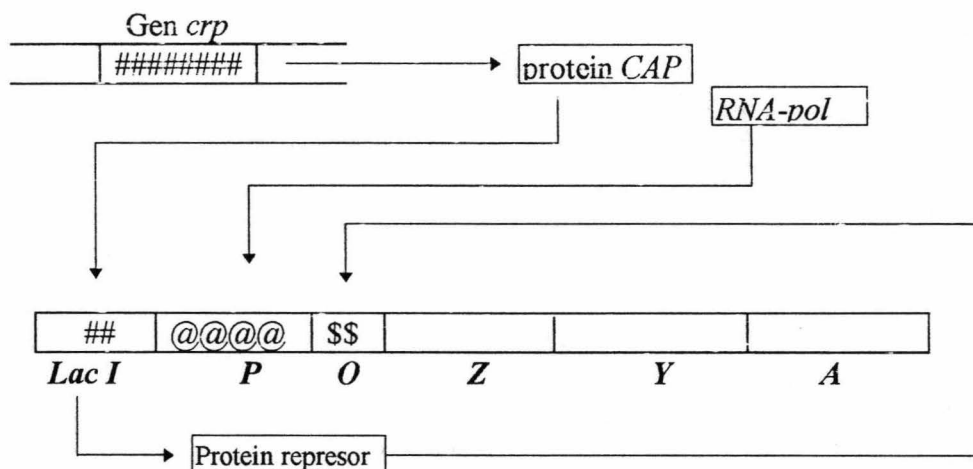
Bakteri dibiakkan pada media cair Luria Bertani (LB) dan dieramkan suhu 37 C semalam. Diambil 1 ml suspensi biakan dan ditampung dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya dilakukan pemisahan plasmid menurut cara baku. (Sambrook *et al.*, 1989). Prinsip pemisahan plasmid cara alkali adalah dinding sel bakteri dihancurkan dengan larutan alkali, setelah dilakukan pemusingan, supernatan yang berisi plasmid dipisahkan. Plasmid dipresipitasi menggunakan etanol dengan pemusingan kecepatan tinggi (12.000 rpm). Cara kerja secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.2 Transformasi plasmid pada *Escherichia coli* kompeten ('Competent *Escherichia coli*')

Tahap ini meliputi: 1). Penyiapan *Escherichia coli* kompeten, sebagai penerima (resipien) atau penangkap plasmid; 2). Transformasi plasmid ke dalam *Escherichia coli* kompeten dan uji ekspresi kekebalan terhadap ampisilin pada media LB.

4.8.2.1 Penyiapan *Escherichia coli* kompeten ('Competent *Escherichia coli*') sebagai penangkap plasmid ('Recipient')

Escherichia coli kompeten adalah *Escherichia coli* acuan sebagai penerima ('recipient') yang diolah secara kimiawi sehingga mudah menangkap plasmid bebas. Dipergunakan *Escherichia coli* galur **DH5 α** yang dikenal efisien menangkap plasmid pada uji transformasi (Sambrook *et al.*, 1989; Miller, 1992). Bakteri ini diketahui mempunyai defek pada gen *lac* sehingga tidak mampu mendegradasi laktosa. Jika dibiakkan pada media MacConkey, maka koloni akan berwarna putih atau tidak berwarna, berbeda dengan *Escherichia coli* sampel yang berwarna merah. Ini bermanfaat pada saat konfirmasi sel transforman hasil uji transformasi. Sel transforman yang betul adalah bersifat kebal ampisilin, dan jika dibiakkan pada media MacConkey akan berwarna putih. Gambaran gen *lac* secara skematis dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1

Struktur gen *Lac* pada *Escherichia coli* (Miller, 1992)

Keterangan: *crp* = gen *crp* pengkode protein CAP;

Lac I, P, O, Z, Y, A = gen *Lac*-operon

CAP = 'Catabolic Activator Protein'

Tatacara pembuatan sel kompeten dilakukan menurut cara baku dengan cara mencuci bakteri menggunakan CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 1989; Nakata, 1997). Tata-cara selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.2.2 Transformasi plasmid pada *Escherichia coli* kompeten dan uji seleksi

Uji ini ditujukan memasukkan plasmid ke *Escherichia coli* kompeten. Selanjutnya diberikan media dan pengeraman khusus untuk ekspresi plasmid kekebalan terhadap ampisilin. Semua dilakukan menurut cara baku (Sambrook *et al.*, 1989; Nakata *et al.*, 1997).

Seleksi dilakukan pada media yang mengandung ampisilin kadar 64 mikrogram per mililiter. Adanya pertumbuhan bakteri pada media seleksi, menunjukkan adanya perubahan *Escherichia coli* kompeten dari peka menjadi kebal, yang berarti ada plasmid kekebalan yang masuk. Kontrol pertumbuhan dilakukan dengan menanam bakteri kompeten tanpa transformasi pada media seleksi, sedangkan kontrol transformasi positif dilakukan dengan melakukan transformasi *pBR322* pada sel kompeten. Plasmid *pBR322* adalah plasmid yang diketahui mengandung gen pengkode kebal ampisilin dan tetrasiklin. Pada setiap melakukan uji transformasi plasmid sampel, selaiu disertai transformasi *pBR322* dan hasil seleksi transforman *pBR322* harus positif. Sebagai media seleksi sebenarnya dapat menggunakan media MacConkey atau Luria Bertani. Namun dalam penelitian ini dipergunakan media Luria Bertani (LB). Hal ini sesuai dengan protokol oleh Nakata *et al.*, (1997), dan juga dari penelaahan pendahuluan oleh peneliti diketahui bahwa penggunaan media LB lebih efisien dibanding media MacConkey. Hasil penelitian pendahuluan tersebut menunjukkan bahwa hasil transformasi pada media LB mendapatkan

jumlah sel transforman dua kali lebih banyak dibanding pada media MacConkey (Kuntaman, 1999).

Cara kerja secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.3 Visualisasi dan peneraan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin

Pada semua sel transforman, dilakukan isolasi plasmid menurut cara baku dengan cara lisis alkali (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid dielektroforese pada agarose 0,8% dengan bufer elektroforese adalah TBE 0,5 X (Tris-Boric acid-EDTA kekuatan 0,5 kali). Sebagai alat penera ('marker') ukuran plasmid, dipergunakan *lambdaHindIII* dengan ukuran tertinggi adalah 23.130 bp dan terendah 125 bp. Ukuran marker secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.7. Elektroforese dijalankan dengan voltase 100 volt dan membutuhkan waktu selama 1 jam. Potongan DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke kutub positif elektroforese, dengan kecepatan berbanding terbalik dengan ukurannya. Selanjutnya agarose dicat dengan etidium bromide 50 ng% (10 mikroliter larutan 1% dalam 200 ml akuades) dalam akuades selama 30 menit dan difoto dengan kamera polaroid menggunakan film hitam putih. Hasilnya adalah pita-pita DNA yang dapat diamati sebagai pita putih dengan latar belakang hitam. Ukuran DNA dapat diperkirakan berdasar kesetaraan kedudukannya terhadap pita DNA marker. DeGuglielmo *et al* (1991) untuk melihat plasmid ukuran sampai 36 Mda (=36.000 Kda = \pm 70 kb) menggunakan agarose 0,8%.

4.8.4 Penentuan ekspresi gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin sebagai penyerta gen pengkode kebal ampisilin pada sel transforman

Semua sel transforman telah diketahui kebal ampisilin. Untuk melihat adanya gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin, perlu dilakukan uji ekspresi kekebalan terhadap berbagai antimikroba. Untuk itu pada semua sel transforman dilakukan uji kepekaan terhadap beberapa antimikroba dengan cara difusi cakram. Tata cara uji kepekaan dilakukan berdasar ketentuan *NCCLS* (Munro, 1992; Sahm and Washington II, 1991). Sebagai pedoman penentuan kepekaan hasil uji, ditentukan berdasar diameter daerah hambatan berdasar ketentuan standard, seperti Tabel 4.2. Cara selengkapnya lihat pada Lampiran 2.

Tabel 4.2
Jenis antimikroba uji dan pedoman penentuan kekebalan pada uji kepekaan cara difusi cakram terhadap sel transforman

Jenis Antimikroba	Lebar daerah hambatan (mililimeter) sebagai pedoman pembacaan kekebalan		
	Kebal (\leq)	Intermediate	Peka (\geq)
1. Ampisilin (AMP10)	13	14-16	17
2. Eritromisin (E15)	13	14-17	18
3. Kloramfenikol (C30)	12	13-17	18
4. Kanamisin (K30)	13	14-17	18
5. Sefaleksin (CL30)	14	15-17	18
6. Sefotaksim (CTX30)	14	15-22	23
7. Sefotiam (CTM30)	14	15-17	18
8. Sulbenisilin (SUL100)	13	14-17	18
9. Tetrasiklin (TE30)	14	15-18	19
10. Trimetoprim (W5)	13	14-15	16

Sebagai antimikroba uji, dipilih 10 cakram antimikroba yang golongannya mencakup sejumlah antimikroba yang dipergunakan di lokasi penelitian dan yang telah dikenal bahwa kebal terhadap antimikroba yang bersangkutan telah dilaporkan dikode

oleh plasmid (Cooksey, 1991). Lihat Tabel 4.3. Antimikroba ini meliputi golongan cincin beta laktam (ampisilin, sulbenisilin, sefaleksin, sefotiam, sefotaksim), eritromisin, kloramfenikol, aminoglikosida (kanamisin), tetrasiklin dan trimetoprim.

Tabel 4.3

Mekanisme kerja dan peran gen kebal pada beberapa antimikroba

Antimikroba	Mekanisme utama kekebalan	Jenis gen yang berperan
Beta laktam	Perusakan oleh enzim	P, K, Tn
Makrolid	Perubahan sasaran obat	P, K, Tn
Kloramfenikol	Perusakan oleh enzim	P, Tn
Aminoglikosida	Perusakan oleh enzim	P, K, Tn
Tetrasiklin	Perubahan sasaran obat, dan Efluks	P, K, Tn
Trimetoprim	Perubahan sasaran obat	P, K, Tn

Keterangan: P=Plasmid; K=Kromosom; Tn=Transposon

4.9 Variabel, Parameter dan Analisis Statistik

4.9.1 Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah tingkat penggunaan ampisilin di lokasi penelitian. Pengamatan dilakukan dengan cara survei penggunaan ampisilin pada penderita rawat inap di lokasi penelitian. Sebagai parameter adalah: a). Prosen penderita rawat inap yang mendapat ampisilin. Skala nominal dan uji statistik menggunakan uji khi kuadrat; b). Dosis (gram) ampisilin (atau antimikroba beta laktam) rata-rata per penderita, yang diberikan pada penderita rawat inap. Skala rasio dan analisis statistik menggunakan uji t bebas.

4.9.2 Variabel tergantung

4.9.2.1 Pola kekebalan

Pola kekebalan dinyatakan *Escherichia coli* yang peka atau kebal terhadap ampisilin. Skala nominal dan analisis statistik menggunakan uji khi kuadrat.

4.9.2.2 Pola kekebalan yang dikode plasmid

Pola kekebalan yang dikode plasmid adalah kekebalan yang dikode dan yang tidak dikode plasmid. Skala nominal dan analisis statistik menggunakan uji khi kuadrat.

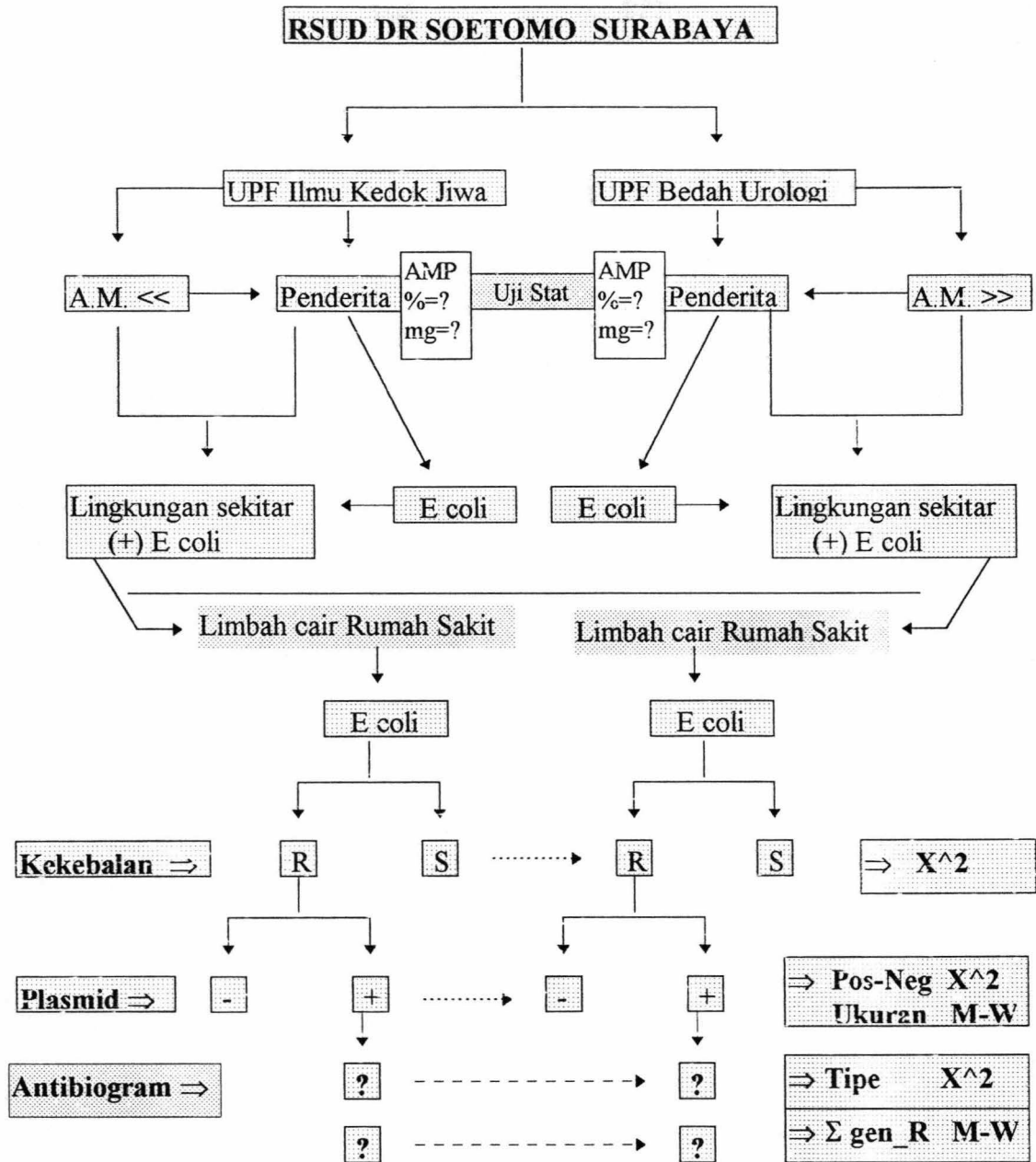
4.9.2.3 Ukuran plasmid

Ukuran plasmid dinyatakan dengan skala ordinal yakni dikelompokkan berdasar kesetaraannya dengan marker yang dipergunakan. Kelompok 1 dengan ukuran plasmid sama atau lebih kecil 4.361 bp, kelompok 2 dengan ukuran antara lebih besar 4.361 bp sampai 9.416 bp dan kelompok 3 lebih besar 9.416 bp sampai 23.130 bp. Ukuran dan spesifikasi marker beserta penjelasannya dapat dilihat pada Bab 5 butir 5.1.3. Perhitungan statistik uji banding ukuran plasmid menggunakan uji Mann-Whitney.

4.9.2.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram pada sei transferman

Plasmid yang berhasil dipisahkan dipastikan mengandung gen pengkode kebal ampisilin. Untuk melihat apakah plasmid tersebut juga mengandung gen pengkode kebal antimikroba yang lain yang sering disebut sebagai kebal ganda (*Multi resistance*), maka plasmid dibagi menjadi beberapa tipe. Tipe plasmid yang sama berarti mengandung jumlah dan jenis ekspresi gen yang sama. Penamaan tipe dilakukan dengan pemberian nomor urut angka, yang didasarkan urut abjad nama antimikroba yang diketahui mempunyai gen kebal sebagai gen penyerta terhadap gen pengkode kebal ampisilin. Penamaan dimulai tipe 1, 2, 3 dan seterusnya. Penjelasan lebih rinci pada bab 5 butir 5.5.

Bagan alir metode penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Bagan alir metode penelitian

Keterangan:

R = Kebal ('Resistant'); S = Peka ('Sensitive'); A.M. = Antimikroba; AMP = Ampisilin; + = Ada; - = Tidak ada; \ll = Sedikit; \gg = Banyak; X^2 = Uji Khi Kuadrat; Pos-Neg = ada atau tidak ada plasmid; Ukuran = Ukuran plasmid; Tipe = Tipe plasmid; M-W = Uji Mann-Whitney; X^2 = Uji Khi Kuadrat; Uji Stat = Uji Statistik yang sesuai; % = Persentase penderita rawat inap yang mendapat ampisilin; mg = berat rata-rata ampisilin (dalam miligram) per penderita; Antibiogram = Hasil uji kepekaan cara difusi cakram pada sel transforman; Σgen_R = Jumlah gen kebal antimikroba