

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare merupakan penyebab kematian kelima di seluruh dunia. Di Amerika Serikat, 179 juta kasus diare akut terjadi setiap tahunnya (Klinis, 2019). Sedangkan di Indonesia menurut data terbaru dari Survei Kesehatan Indonesia (SKI) yang dilakukan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2023 ditemukan sebanyak 877.531 kasus diare dengan pulau jawa sebagai penyumbang kasus diare terbanyak.

Dari data yang dirilis oleh Survei Kesehatan Indonesia tersebut, selain pulau jawa sebagai pemegang kasus terbanyak ternyata didapatkan bahwa, dari 38 Provinsi yang ada di Indonesia, Provinsi Sulawesi Selatan berada di urutan ke Tujuh dengan kasus terbanyak di Indonesia setelah Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Sumatra Utara, Banten, DKI Jakarta, yaitu sebanyak (29.481 kasus). Hal ini menunjukkan bahwa Sulawesi selatan masih menjadi salah satu dari 10 provinsi dengan kasus diare terbanyak di Indonesia, Sehingga perlu untuk mendapatkan perhatian khusus agar dapat menanggulangi adanya kemungkinan kemunculan kejadian luar biasa (KLB) yang disebabkan oleh diare.

Berdasarkan data pemetaan penyakit yang berpotensi menyebabkan KLB oleh Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Makassar (BTKLPP) pada periode semester 1 (minggu ke 1 s/d 24) tahun 2022 ditemukan bahwa di Provinsi Sulawesi Selatan dapat diketahui terdapat penyakit dengan kasus tertinggi adalah diare sejumlah 39.452 kasus, sehingga sangat berpotensi terjadinya kejadian luar biasa. Pada pemetaan penyakit diare akut yang terjadi di Sulawesi Selatan tersebut, Makassar menjadi kota dengan kasus diare akut terbanyak di Sulawesi Selatan dengan 4.611 kasus.

Selain data yang disajikan dari hasil Survei Kesehatan Indonesia dan hasil

pendataan dari BTKLPP, hal tersebut juga dapat terlihat dari hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Hardianti pada tahun 2025 yang mengamati tren penyakit tertinggi berdasarkan laporan surveilans terpadu pada tahun 2021 – 2023 Di Provinsi Sulawesi Selatan, dari data sekunder yang dikumpulkan tersebut terlihat bahwa diare menjadi penyakit dengan kasus terbanyak yang terjadi dibandingkan dengan penyakit lainnya.

Dari data yang telah dikumpulkan dari puskesmas yang berada di 24 Kabupaten Kota Di Propinsi Sulawesi Selatan ditemukan bahwa diare menjadi penyakit yang paling banyak diantara penyakit yang lainnya. Selain daripada itu, diare mengalami tren kenaikan yang sangat signifikan selama 3 tahun tersebut. Pada tahun 2021 terdapat 16.117 kasus, 2022 48.523 kasus dan pada tahun 2023 sebanyak 65.854 kasus. Dari grafik tersebut juga dapat dilihat bahwa perbedaan jumlah kasus diare dengan penyakit yang lain memiliki jumlah yang relatif signifikan. Berbeda dengan yang terjadi Di Puskesmas, data yang dikumpulkan dari 24 Kabupaten Kota di Provinsi Sulawesi Selatan khususnya di Rumah Sakit dengan kasus rawat jalan didapatkan hasil bahwa diare menjadi penyakit dengan kasus terbanyak yaitu 4.525 kasus di tahun 2023, di ikuti oleh penyakit pneumonia, influenza, tuberkulosis dan penyakit lain setelahnya.

Selain data dari Puskesmas dan Rumah sakit (Rawat Jalan), data kasus penyakit yang dilaporkan juga telah dikumpulkan khususnya pasien rawat inap di Rumah sakit yang ada Di Provinsi Sulawesi Selatan. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa kasus rawat inap dan rawat jalan serta puskesmas memiliki kecenderungan yang sama, yaitu penyakit dengan kasus terbanyak adalah diare. Pada tahun 2021 kasus diare dilaporkan sebanyak 2.815 kasus, kemudian terjadi kenaikan selama 2 tahun setelahnya yaitu pada tahun 2022 ditemukan sebanyak 6.336 kasus serta terjadi kenaikan bahkan dua kali lipat di tahun 2023 dengan 12.088 kasus (Hardianti et al., 2025)

Hasil penelitian tersebut juga terkonfirmasi jika ditarik ke beberapa tahun

sebelumnya, hal ini juga sejalan dengan Riset Kesehatan Dasar yang dilakukan pada tahun 2018 yang memperlihatkan bahwa 8% orang yang mengalami diare di Indonesia. Sehingga diperkirakan bahwa sekitar 200 hingga 400 kasus diare per 1.000 orang (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI 2018).

Perkembangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan dimulai sejak lahir dan berlangsung bertahap hingga dewasa, dipengaruhi oleh lingkungan dan asupan makanan. Saluran cerna mengandung mikroorganisme patogen dan nonpatogen yang berperan penting dalam pembentukan sistem imun. Ketidakseimbangan mikrobiota akibat pertumbuhan bakteri patogen yang berlebihan dapat menurunkan jumlah probiotik, sehingga menyebabkan gangguan penyerapan zat gizi dan meningkatkan risiko diare. (Simanjuntak, Annisa dan Saputra, 2022).

Penyakit diare merupakan penyakit yang disebabkan dari lingkungan sekitar, yang merupakan kondisi buang air besar lebih dari tiga kali dalam 24 jam dan disebabkan oleh infeksi mikroba, seperti bakteri, virus, parasit, protozoa, dan menyebar melalui fecal-oral route (WHO,2017). Diare menyerang anak-anak mulai dari balita dan orang dewasa dengan kelompok sosial yang berbeda yang menjadi penyebab utama morbiditas dan kematian pada balita (Effendi, 2022). Berdasarkan durasinya, diare dibedakan menjadi diare akut yang berlangsung kurang dari 14 hari dan diare kronik yang berlangsung lebih dari 14 hari dengan konsistensi tinja lebih cair. Diare kronik umumnya diklasifikasikan menjadi watery, malabsorption dan inflammatory diarrhea. Gejala diare meliputi mual, muntah, demam, nyeri perut, dehidrasi dan infeksi saluran pencernaan. (Kresnamurti, Aziz dan Eko Wahyudi, 2022).

Diare akut yang berlangsung 7–14 hari disebut diare berkepanjangan, sedangkan diare yang berlangsung lebih dari 14 hari dikategorikan sebagai diare persisten. Diare persisten umumnya terjadi akibat infeksi enterik berulang yang menyebabkan kerusakan mukosa usus, sehingga memicu siklus diare, malnutrisi, dan infeksi lanjutan. Istilah diare berkepanjangan dan

persisten penting secara epidemiologis di negara berpendapatan rendah hingga menengah karena berkaitan dengan tingginya risiko morbiditas dan mortalitas pada anak (Shankar, Rosenbaum dan Diare, 2020).

Penelitian yang juga telah dilakukan sebelumnya oleh (Agus Iryanto, Joko & Raharjo, 2021) menyebutkan bahwa terdapat beberapa faktor yang menjadi sebab tingginya kasus diare Di Indonesia yaitu pengetahuan orang tua, kondisi lingkungan, akses air bersih, pengelolaan limbah yang baik dan kebersihan pribadi menjadi komponen utama dalam menjaga serta mencegah penyakit khususnya diare. Hal yang sama juga dikemukakan oleh (Irawan et al, 2024) bahwa kondisi lingkungan menyebabkan diare, seperti kualitas air sumur warga setempat dapat terkontaminasi oleh polutan berbahaya dari sungai yang tercemar sehingga meningkatkan risiko terjadinya diare dan penyakit berbasis air lainnya serta adanya faktor iklim tropis juga menjadi salah satu faktor masih tingginya kejadian diare.

Tingginya kasus diare akut yang terjadi di Sulawesi Selatan Khususnya Di Kota Makassar disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya; kepadatan penduduk, pengelolaan sanitasi yang buruk, pola konsumsi dan kesehatan masyarakat yang buruk serta adanya pengaruh cuaca khususnya musim penghujan yang menjadi salah satu faktor penyebab penyebaran kasus diare akut di Masyarakat. Hal Ini juga sejalan dengan pendataan yang telah dilakukan oleh BTKLPP pada Periode 6 Bulan pertama di tahun 2022 yang merupakan musim penghujan di Sulawesi Selatan, sehingga ini tentunya perlu menjadi perhatian agar kasus diare Kota Makassar dapat terkendali.

Dari kebanyakan kasus diare yang terjadi, bakteri yang menjadi penyebab yang sering ditemukan dikarenakan adanya infeksi dari bakteri *Escherichia coli*. Meskipun demikian, beberapa spesies *E. coli* memiliki beberapa faktor virulensi yang memungkinkan mereka menyebabkan berbagai macam penyakit infeksi ekstraintestinal pada usus manusia. Pada dasarnya meliputi lima strain *E. coli* diaregenik (DEC), yaitu *E. coli* enterotoksigenik (ETEC), *E. coli* enteroagregatif (EAEC), *E. coli* enteropatogenik (EPEC), *E. coli*

enterohemoragik (EHEC), *E. coli* enteroinvasif (EIEC).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan dari kumpulan data yang telah dipaparkan sebelumnya, baik dari kementerian maupun penelitian yang telah dibahas sebelumnya pada latar belakang, sehingga menunjukkan bahwa penyakit diare menjadi penyakit yang perlu perhatian untuk segera ditindaklanjuti guna mencegah terjadinya kemungkinan hal yang lebih buruk khususnya di Sulawesi Selatan.

Oleh karena itu, berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah diuraikan sebelumnya maka penting untuk mengetahui bakteri penyebab serta patogenitasnya sehingga dapat menyebabkan diare pada anak di Kota Makassar melalui pemeriksaan feses yang akan dilakukan Di HUMRC (Hasanuddin University Medical Reserch Center) dengan sampel yang berasal dari Sekolah Dasar dan Panti Asuhan di Laniang Kota Makassar untuk dapat menganalisis keberadaan bakteri penyebab diare pada siswa di sekolah dan panti tersebut dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction*.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* yang menjadi penyebab diare pada anak di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan di Laniang Kota Makassar melalui sampel feses yang dianalisis menggunakan metode PCR
2. Untuk mengetahui jenis strain bakteri *E. coli* yang menjadi penyebab diare pada anak di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan di Kota Makassar melalui sampel feses yang dianalisis menggunakan metode PCR

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- a) Menambah wawasan dan pengetahuan lebih tentang bakteri penyebab diare,
- b) Sebagai sumber referensi untuk peneliti lain yang akan melakukan penelitian lebih lanjut,
- c) Dapat digunakan sebagai masukan oleh dinas terkait khususnya tempat pelayanan kesehatan seperti puskesmas, rumah sakit, serta dokter tentang pencegahan diare,
- d) Sebagai verifikasi terhadap teori-teori sebelumnya mengenai penyakit dan kejadian diare.

1.4.2 Manfaat Praktis

- a) Bagi Institusi Pendidikan, Sebagai bentuk pengabdian dalam bentuk karya ilmiah dan menjadi informasi dalam rangka meningkatkan mutu pendidikan dan memperkaya referensi ilmu pengetahuan bagi mahasiswa mahasiswa Universitas Hasanuddin terkhusus mahasiswa Ilmu Biomedik.
- b) Bagi Peneliti, Menambah pengetahuan dan keterampilan serta memperluas wawasan peneliti tentang bakteri yang menjadi penyebab diare.
- c) Bagi Instansi Pemerintahan, Menjadi bahan evaluasi landasan untuk pengembangan kebijakan dan evaluasi kebijakan tentang penyakit diare di masyarakat.

1.5 Kerangka Teori

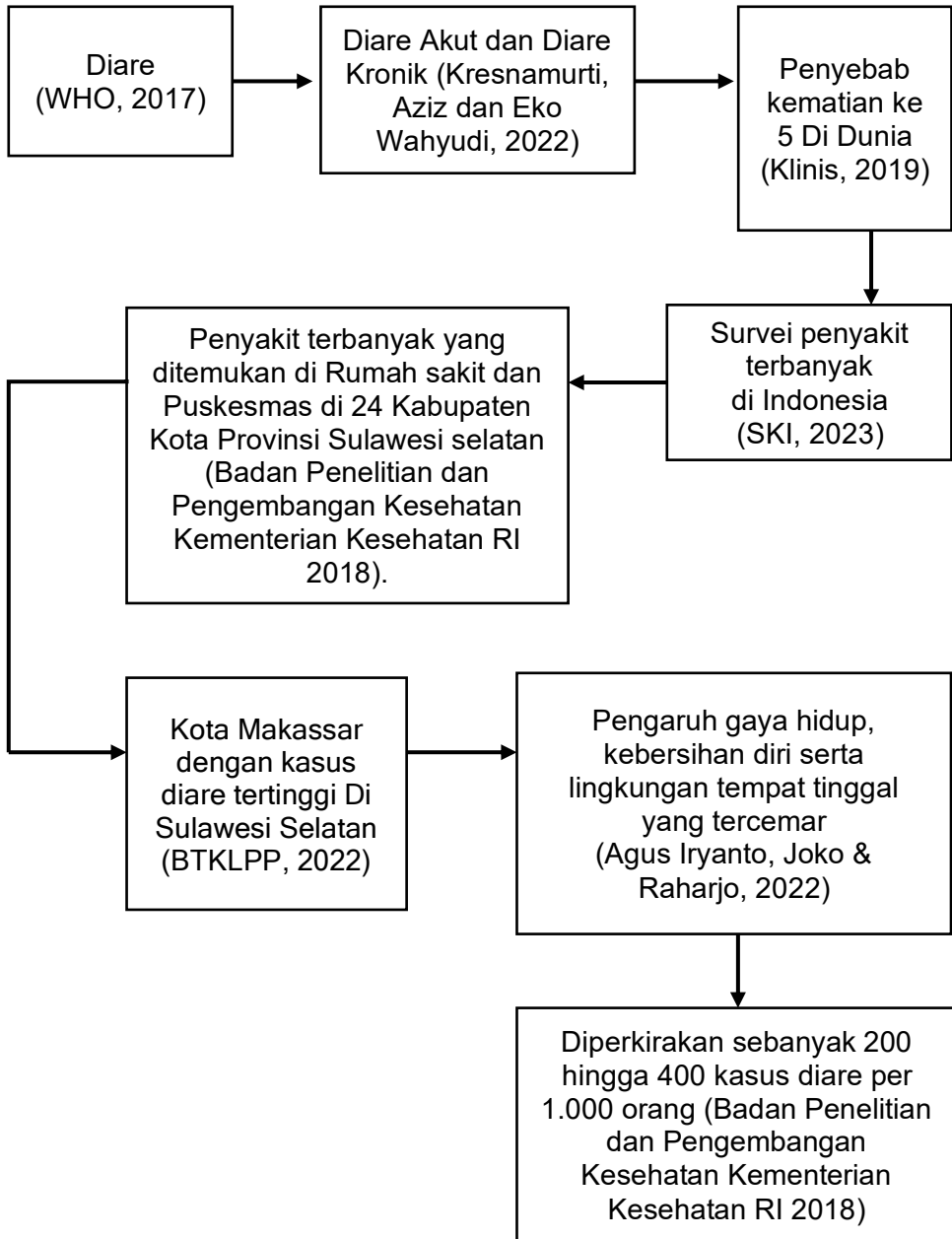
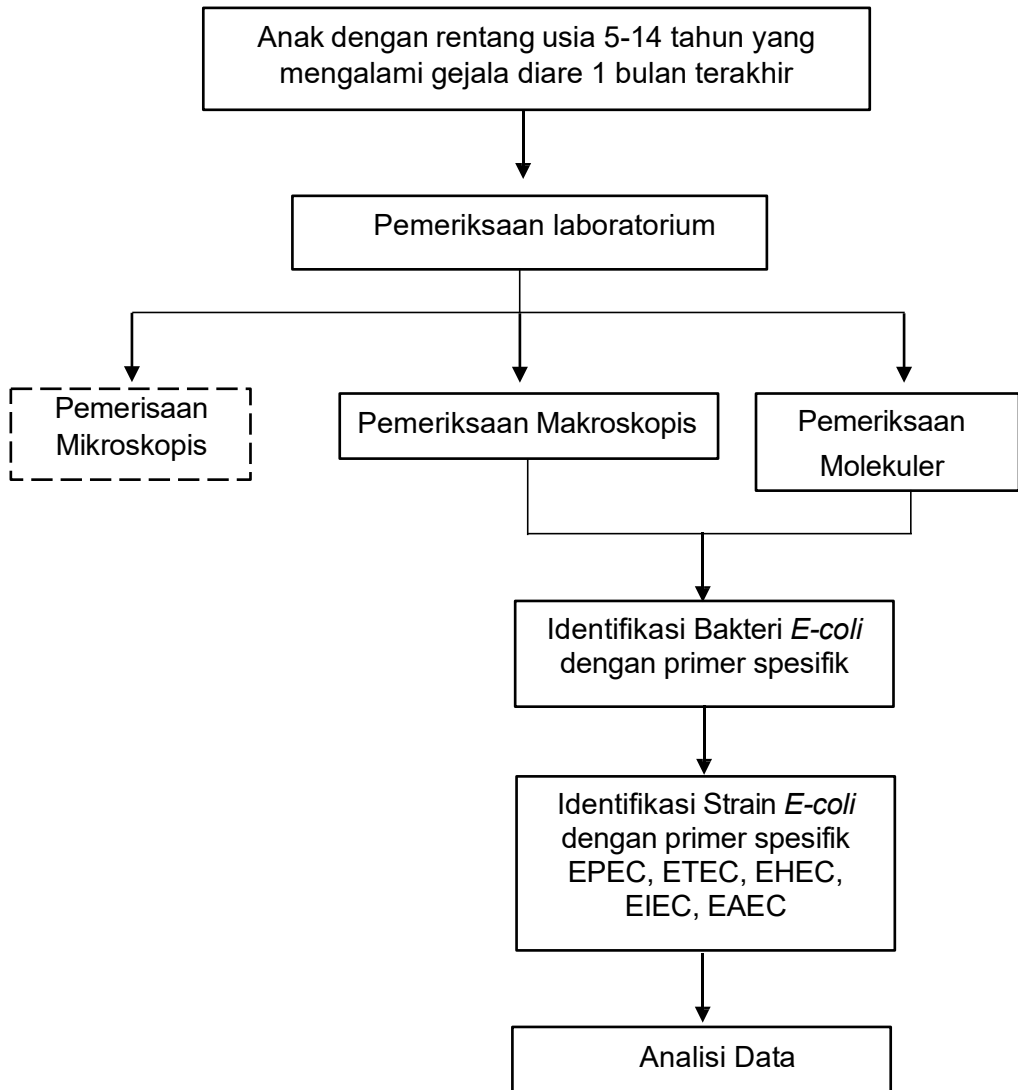


Diagram 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Keterangan:

----- : Tidak Diteliti

———— : Diteliti

Diagram 2. Kerangka Konsep

1.7 Definisi Operasional

1. Diare, siswa/i yang mengalami gejala sakit perut, muntah, mual, demam dan Buang air besar dengan konsistensi cair selama satu bulan terakhir.
2. Sampel feses, materi biologis berupa tinja yang diambil dari siswa/i Sekolah Dasar dan Panti Asuhan sebagai bahan analisis dalam pemeriksaan laboratorium.
3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, alat yang digunakan dalam analisis sampel feses yaitu metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri *E. coli* yang menjadi penyebab diare.
4. Mendapatkan edukasi tentang diare, siswa/i yang pernah mendapatkan edukasi, pembelajaran dan informasi terkait diare baik dari segi pengertian, cara menjaga kesehatan diri dan lingkungan.
5. Riwayat rawat inap, siswa/i yang pernah menjalani perawatan rawat inap di fasilitas kesehatan akibat diare baik di rumah sakit maupun puskesmas selama 3 bulan terakhir.
6. Riwayat konsumsi antibiotik. siswa/i yang pernah mengonsumsi antibiotik jenis apapun ketika mengalami gejala diare selama 3 bulan terakhir.
7. Mencuci tangan sebelum makan, siswa/i yang melakukan personal hygiene dengan cara mencuci tangan ketika ingin mengonsumsi makanan ataupun minuman.
8. Konsumsi air utama di rumah, jenis air yang digunakan untuk konsumsi harian keluarga di rumah.
9. Memotong kuku secara berkala, kebiasaan personal hygiene siswa/i dalam memotong kuku setiap satu atau dua minggu sekali.
10. Mengonsumsi makanan cepat saji dan kaki lima, kebiasaan siswa/i

mengonsumsi makanan atau jajanan tidak sehat yang berasal dari makanan cepat saji dan pedagang kaki lima.

11. Mencuci tangan setelah buang air besar, kebiasaan personal higiene siswa/i dalam mencuci tangan menggunakan sabun setelah buang air besar.
12. Sumber air utama, jenis air yang digunakan untuk menunjang keperluan sehari-hari di rumah seperti mencuci, mandi dan lainnya.
13. Sering terbentuk genangan air, kondisi lingkungan sekitar tempat tinggal siswa/i yang sering terbentuk genangan air/banjir ketika turun hujan.
14. Pembuangan limbah rumah tangga yang baik, pembuangan limbah rumah tangga berupa limbah biologis seperti tinja dan urine yang sesuai standar yang telah ditetapkan yaitu (SNI 2398:2017) yang menyebutkan bahwa jarak aman septic tank terletak minimal 10 meter dari sumur bor.
15. Ya, jawaban dari siswa/i atas pertanyaan dari kuisisioner untuk memverifikasi kebenaran dari keadaan tertentu sesuai dengan kenyataan yang ada dilapangan.
16. Tidak, jawaban dari siswa/i atas pertanyaan dari kuisisioner untuk memverifikasi ketidakbenaran dari keadaan tertentu dan ketidaksesuaian dengan kenyataan yang ada dilapangan.
17. Sering, pilihan jawaban untuk siswa/i dalam menjawab pertanyaan pada kuisisioner terhadap kebiasaan atau kegiatan tertentu dengan intensitas 85% hingga 100% atau 5 sampai 7 hari dalam seminggu.
18. Kadang-kadang, pilihan jawaban untuk siswa/i dalam menjawab pertanyaan pada kuisisioner terhadap kebiasaan atau kegiatan tertentu dengan intensitas 40% hingga 60% atau 3 sampai 4 hari dalam seminggu.

BAB II METODE PENELITIAN

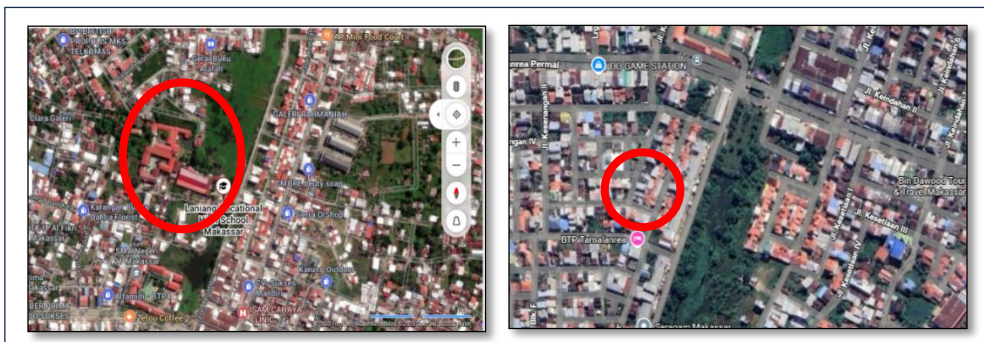
2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan *cross-sectional* dengan rancangan observasional analitik. Desain ini dipilih karena memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi keberadaan strain bakteri *E. coli* pada satu titik waktu tertentu berdasarkan hasil pemeriksaan molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* pada sampel feses subjek penelitian.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

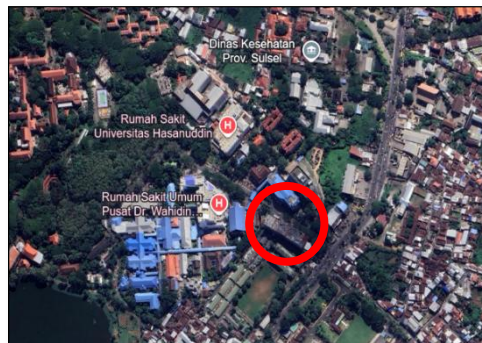
Penelitian direncanakan berlangsung selama tiga bulan, yaitu pada bulan Maret hingga Mei 2025. Rentang waktu tersebut disesuaikan dengan periode musim penghujan di Kota Makassar yang berpotensi meningkatkan kejadian diare, serta untuk memastikan kecukupan waktu dalam pengumpulan sampel, pemeriksaan laboratorium, dan analisis data.

Penelitian dilaksanakan di tiga lokasi yang berbeda. Proses pengambilan sampel dilakukan di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan yang berlokasi di Laniang, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Pemilihan lokasi ini didasarkan pada tingginya angka kejadian diare di Kota Makassar.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel siswa di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan

Analisis laboratorium dilakukan di Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC), lokasi ini dipilih karena memiliki fasilitas dan peralatan yang memadai untuk menunjang pemeriksaan mikrobiologi dan molekuler terhadap sampel yang telah diperoleh serta jarak dari lokasi pengambilan sampel yang relatif terjangkau.



Gambar 2. Hasanuddin University Medical Research Center sebagai lokasi analisis sampel

2.3 Populasi Penelitian

Populasi penelitian meliputi seluruh siswa/i Sekolah Dasar serta anak yang tinggal di Panti Asuhan di Laniang, Kota Makassar, dengan jumlah populasi terdata sebanyak 167 anak, yang terdiri atas 142 anak dari Sekolah Dasar dan 25 anak dari Panti Asuhan. Seluruh populasi tersebut dipilih karena berada pada kelompok usia yang rentan terhadap kejadian diare dan tinggal pada lingkungan yang relatif homogen. Dengan demikian, populasi ini dinilai representatif untuk menggambarkan kondisi kesehatan, lingkungan, dan risiko kejadian diare pada anak di wilayah penelitian.

2.4 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah siswa/i yang berada di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan di Laniang Kota Makassar dengan rentang usia 5-14 tahun. Usia tersebut menjadi perhatian karena berdasarkan hasil dari data yang didapatkan dari data Survei Kesehatan Indonesia pada tahun 2023,

Anak dengan rentang usia tersebut merupakan usia yang sangat rentan terhadap penyakit diare. Hal ini disebabkan karena anak dengan rentang usia tersebut belum memiliki pemahaman yang cukup, minim edukasi, perilaku hidup tidak sehat dan konsumsi makanan serta minuman yang tidak sehat, serta kurangnya perhatian khusus terhadap rentang usia tersebut jika melihat dari prioritas dan program yang dilakukan oleh pemerintah.

2.5 Kriteria Sampel Penelitian

2.5.1 Kriteria Inklusi Penelitian

- a) Siswa/i yang bersedia berpartisipasi selama penelitian dengan kesadaran penuh tanpa paksaan,
- b) Siswa/i yang hadir secara reguler dan mengikuti seluruh rangkaian proses selama periode penelitian berlangsung,
- c) Siswa/i yang memiliki gejala sakit perut, mual, buang air besar dengan konsistensi cair, dan demam dalam waktu sebulan terakhir
- d) Membawa sampel feses dengan jumlah dan sesuai prosedur yang telah diedukasikan sebelumnya.

2.5.2 Kriteria Eksklusi Penelitian

- a) Siswa/i yang tidak hadir ketika sosialisasi prosedur penelitian namun hadir dan membawa sampel pada saat pengumpulan sampel
- b) Siswa/i yang memiliki usia diluar 5-14 tahun
- c) Siswa/i yang membawa sampel tidak sesuai prosedur pengambilan sampel

2.6 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan pendekatan *purposive sampling* yaitu dengan mengumpulkan sampel yang didasarkan pada pertimbangan tertentu. Sehingga penelitian akan memastikan bahwa sampel yang dipilih relevan dengan tujuan penelitian, pada penelitian ini pengambilan sampel dilakukan dengan mengidentifikasi calon subjek penelitian yang memiliki riwayat gejala diare selama satu bulan terakhir serta melakukan sosialisasi teknik pengambilan sampel.

2.7 Jumlah Perkiraan Sampel Penelitian

Berdasarkan populasi yang ditetapkan, sampel penelitian akan diambil dari siswa dengan rentang umur 5-14 tahun di Sekolah Dasar dan Panti Asuhan Di Laniang Kota Makassar. Untuk memastikan hasil penelitian yang representatif dan valid secara statistik dengan mempertimbangkan keterbatasan sumber daya, peneliti akan menggunakan metode proporsi prevalensi *Lemeshow* (Lemeshow, 1997). Penentuan jumlah sampel dilakukan menggunakan rumus proporsi prevalensi *Lemeshow* dengan tingkat kepercayaan 95%. Berdasarkan perhitungan tersebut, jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 40 sampel, sehingga jumlah tersebut dianggap telah mewakili populasi penelitian secara statistik.

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2})^2 pq N}{d^2(N - 1) + (Z_{1-\alpha/2})^2 pq}$$

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2})^2 pqN}{d^2(N-1) + (Z_{1-\alpha/2})^2 pq}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0,16 \times 0,84 \times 167}{(0,1)^2 (167 - 1) + (1,96)^2 \times 0,16 \times 0,84}$$

$$n = \frac{86,22394368}{1,66 + 0,51631104}$$

$$n = \frac{86,22394368}{2,17631104}$$

$$n = 39,619310886737$$

$$n \approx 40 \text{ sampel}$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel

$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$ (untuk tingkat kepercayaan 95%)

p = Perkiraan proporsi 16% (0,16)

q = 1 - p

d = Presisi absolut 10% (0.1)

N = Besar Populasi

2.8 Diagram Alir Penelitian

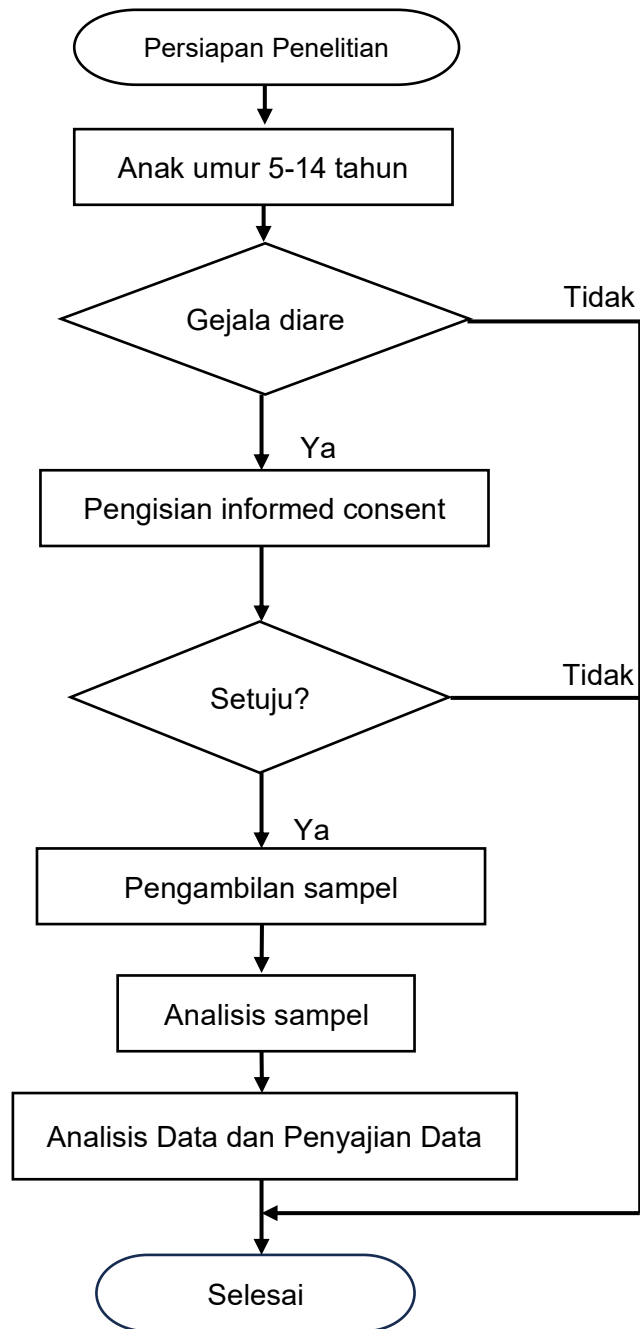


Diagram 3. Diagram alur penelitian

2.9 Alat dan Bahan Penelitian

2.9.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi; multiplex PCR, mesin elektroforesis, autoclave, sentrifuge, rotator, refrigerator, waterbath, oven, vortex mixer, inkubator, mikropipet (1000ul, 100ul, 20ul, 10ul, 2ul), neraca analitik, spatula, gelas ukur, ose steril, cetakan agarose, botol media, erlenmeyer, cawan petri, spidol permanen, pulpen, coolbox, pot sampel steril, tabung efendorf, tabung PCR, kotak sampel DNA, plastik, isolasi bening, label, tips mikropipet, gunting.

2.9.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi; Sampel feses, Kit Ekstraksi DNA dari GS300 Geneaid gSYNC™ DNA Extraction Kit, Enzyme Go Taq Green MasterMix Merk Promega, Primer spesifik *E. coli* (One Step PCR E-coli), Primer *E. coli* Diaregenik, RNase Free water, Ethidium bromida, Aquadest, Larutan TBE 0,5 , Agarose, media MacConkey Agar, Media PBS, Media TSB, DNA Leader.

Primer		Urutan	Pasangan basa (bp)
One step PCR <i>E. coli</i> (<i>uidA</i>)	F	GTCACGCCGTATGTTATTG	530
	R	CCAAAGCCAGTAAAGTAGAAC	
EPEC (<i>eaeA</i>)	F	CACCGTTACCGCAGGTGTGA	450
	R	GTTGCCGCTTCAGCAGGAGT	
EHEC (<i>hlyA</i>)	F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
EAEC (<i>CVD 432</i>)	F	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630
	R	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	
ETEC (<i>elt</i>)	F	CTCTATGTGCACACGGAGC	322
	R	CCATACTGATTGCCGCAAT	
EIEC (<i>ial</i>)	F	CTGGTAGGTATGGTGAGG	320
	R	CCAGGCCAACAATTATTTCC	

Tabel 1. Urutan pasangan basa primer spesifik *E. coli* dan primer strain *E. coli*

2.10 Prosedur Penelitian

2.10.1 Identifikasi Subjek Penelitian

Penelitian diawali dengan mengidentifikasi subjek penelitian yang sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditentukan sebelumnya, dengan cara meminta persetujuan terkait maksud dan tujuan dilakukannya penelitian kepada penanggungjawab instansi pendidikan terkait, dinas kesehatan setempat, pemerintah setempat, calon subjek penelitian dan orang tua calon subjek penelitian.

Proses selanjutnya yaitu meminta kepada subjek dan orang tua subjek penelitian untuk mengisi kuisioner, informed consent, identitas subjek, menjelaskan cara pengambilan sampel serta pemberian alat dan bahan yang akan digunakan untuk pengambilan sampel.

2.10.2 Pengambilan Sampel

Pengambilan dan pengumpulan sampel dilakukan dengan meminta subjek untuk menampung sampel fesesnya ke dalam pot sampel steril yang telah dibagikan sebelumnya sebanyak 5-10 gram, kemudian menutup rapat pot sampel yang telah diberikan kode unik sebelumnya untuk menjaga kerahasiaan data subjek, pot sampel kemudian dikumpulkan ke dalam coolbox (Rizky et al., 2021).

2.10.3 Pengiriman Sampel

Sampel feses yang telah didapatkan dari siswa/i pada kedua lokasi pengambilan sampel kemudian dibawa dengan hati-hati dan secepat mungkin ke Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin dengan menggunakan coolbox sebelum 2 jam (Li et al., 2023).

2.10.4 Pembuatan Media MacConkey Agar

Pembuatan media MacConkey Agar diawali dengan menimbang media sebanyak 51,53 gram, memasukkan Aquadest ke dalam botol

steril sebanyak 1000 ml kemudian dilarutkan hingga homogen. Jika telah homogen, media kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, menuangkan media ke dalam cawan petri steril sebanyak 20-25 ml. Jika media telah memadat kemudian media dimasukkan ke dalam inkubator untuk menghilangkan sisa-sisa embun yang ada pada cawan petri, memberi label atau tanda waktu pembuatan media. (Miri et al., 2017)

2.10.5 Pembuatan Tryptic Soy Broth

Menimbang Media Tryptic Soy Broth (TSB) sebanyak 1,5 gram dengan pelarut Aquadest sebanyak 50 ml kemudian dihomogenkan di dalam erlenmeyer, Jika telah homogen, media kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, memipet masing-masing 1 ml media ke dalam cryovial tube. (Sianturi & Ihsan, 2023)

2.10.6 Pembuatan Media Phosphate Buffer Saline (PBS)

Menimbang media Phosphate Buffer Saline (PBS) sebanyak 0,5 gram dengan pelarut aquadest sebanyak 50 ml kemudian dihomogenkan di dalam erlenmeyer, Jika telah homogen, media kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, memipet masing-masing 1 ml media ke dalam cryovial tube (Sidauruk et al., 2024).

2.10.7 Inokulasi Sampel Pada Media MacConkey Agar

Memberi label atau kode terlebih dahulu pada cawan petri yang akan di inokulasi, kemudian mengambil sedikit sampel feses dengan menggunakan ose steril kemudian menggosokkan sampel tersebut pada permukaan media MacConkey Agar, mulai dari tepi hingga ke tengah cawan petri, lalu menutup cawan petri dengan rapat (Ahmed,

N. J. 2021).

2.10.8 Inkubasi Sampel

Sampel yang telah distreaking sebelumnya dengan menggunakan ose steril pada media MacConkey Agar kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C (Rizky et al., 2021).

2.10.9 Pengayaan Sampel Pada Media TSB dan PBS

Mengambil sedikit koloni sampel yang telah distreaking sebelumnya pada media MacConkey Agar dengan menggunakan ose steril, kemudian memasukkan sampel tersebut ke dalam masing-masing media TSB dan PBS dengan cara menggerakkan ose naik turun hingga koloni yang telah diambil tersebut homogen dengan media TSB dan PBS, lalu menginkubasi sampel tersebut pada suhu -20°C.

2.10.10 Ekstraksi DNA Sampel

Proses ekstraksi DNA pada sampel dimulai dari preparasi sampel yaitu dengan cara membuat suspensi bakteri (bakteri Mac Farland 0,5-1) di dalam tabung *ependorf* kemudian menambahkan 200 ul PBS dan 20 ul proteinase K. Proses selanjutnya yaitu cell lysis, dengan cara menambahkan 200 ul GSB buffer vortex, kemudian diinkubasi pada suhu 60° selama 20 menit, dimana setiap 5 menit divortex. Tahap selanjutnya yaitu DNA binding, menambahkan 200 ul ethanol vortex selama 10 detik. Memasukkan ke dalam GS column dalam 2 ml collection tube, lalu disentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit kemudian membuang cairan pada collection tube.

Selanjutnya memasuki proses wash, dengan cara menambahkan 400 ul W1 buffer, lalu di sentrifuge dengan kecepatan

15.000 rpm selama 30 detik, membuang cairan pada collection tube, menambahkan 600 ul wash buffer dan disentrifuge 15.000 rpm selama 30 detik. Mengganti collection tube dengan yang baru, sentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 3 menit. Lalu ditutup dengan prosedur elution, dengan cara memindahkan GS column ke tabung *ependorf* steril, menambahkan 100 ul elution buffer yang sebelumnya telah dipanaskan, sentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik lalu membuang GS column. Cairan yang terdapat pada tabung *ependorf* merupakan DNA sampel yang siap untuk di PCR.

2.10.11 Mix PCR

DNA sampel yang telah didapatkan kemudian ditambahkan dengan primer yang akan digunakan, yaitu:

One Step PCR *E. coli*

Go Taq Master Mix	: 12,5 ul
Primer Forward <i>uidA</i> 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse <i>uidA</i> 10 UM	: 1,0 ul
Nuclease-Free Water	: 6,5 ul
DNA Sampel	: 5,0 ul
Total	: 25 ul

MIX 1 (ETEC, EAEC, dan EHEC)

Go Taq Master Mix	: 25,0 ul
Primer Forward ETEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse ETEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Forward EAEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse EAEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Forward EHEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse EHEC 10 UM	: 1,0 ul
Nuclease-Free Water	: 9,0 ul
DNA Sampel	: 10,0 ul
Total	: 50 ul

MIX 2 (EPEC dan EIEC)

Go Taq Master Mix	: 25,0 ul
Primer Forward EPEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse EPEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Forward EIEC 10 UM	: 1,0 ul
Primer Reverse EIEC 10 UM	: 1,0 ul
Nuclease-Free Water	: 11,0 ul
DNA Sampel	: 10,0 ul
Total	: 50 ul

2.10.12 Running PCR

Running PCR dimulai menggunakan primer One Step PCR E. coli dengan gen target uidA dengan tahapan (Pre-Denaturasi) siklus 1 sebanyak 1x suhu 95°C selama 5 menit, siklus 2 sebanyak 35 siklus, lalu dilanjutkan dengan tahapan (Denaturasi) pada suhu 95°C selama 30 detik, (Annealing) pada suhu 58°C selama 1 menit, (Extension) pada suhu 72°C selama 90 detik, kemudian (Final Extension) siklus 3 sebanyak 1x suhu 72°C selama 10 menit.

Tahapan selanjutnya yaitu running PCR Multiplex 1 dengan menggunakan gen target dan primer elt untuk ETEC, CVD 432 untuk EAEC dan hlyA untuk EHEC, tahap siklus 1 sebanyak 1 kali pada suhu 94°C selama 1 Menit (Pre-Denaturasi), siklus 2 sebanyak 35 siklus tahap 1 suhu 94°C selama 1 Menit (Denaturasi), tahap 2 Suhu 55°C selama 1 Menit (Annealing), tahap 3 Suhu 72 °C selama 1 Menit (Extension), siklus 3 sebanyak 1x suhu 72°C selama 5 menit (Final Extension).

Multiplex 2 dilakukan dengan menggunakan gen target dan primer eaeA untuk EPEC dan ial untuk EIEC, siklus 1 sebanyak 1x suhu 95°C selama 1 menit (Pre-Denaturasi), siklus 2 sebanyak 35 siklus, tahap 1 Suhu 94°C selama 1 Menit (Denaturasi), siklus 2 suhu 57°C selama 1 Menit (Annealing), tahap 3 suhu 72°C selama 90 detik (Extension), siklus 3 sebanyak 1x suhu 72°C selama 10 menit

(Final Extension).

2.10.13 Elektroforesis

Membuat gel agarose terlebih dahulu dengan cara menimbang agarose sebanyak 3 gram kemudian menambahkan larutan Tris Borat EDTA (TBE) sebanyak 300 ml, menghomogenkan larutan tersebut lalu dipanaskan dengan menggunakan microwave pada suhu 100°C selama 2 menit, mengulangi prosedur pemanasan tersebut jika agarose belum larut sepenuhnya, kemudian menambahkan Ethidium Bromida 1% ke dalam larutan gel agarose sebanyak 6 ul lalu dihomogenkan.

Kemudian menuangkan larutan agarose tersebut ke dalam cetakan gel elektroforesis, menunggu gel agarose hingga mengering, melepaskan agarose dari cetakan kemudian meletakkan gel tersebut ke alat elektroforesis, memipet sampel masing-masing 12 ul kemudian memasukkan sampel tersebut ke dalam lubang pada cetakan agarose yang sebelumnya telah dibuat, memipet 6 ul Blue Juice Loading dye ke dalam setiap baris agarose, memipet masing-masing 12 ul kontrol positif dan kontrol negatif ke dalam setiap baris gel agarose, menyalakan alat elektroforesis kemudian menyatel waktu selama 120 menit.

2.11 Analisa Data

Data yang telah terkumpul dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS versi 30. Analisis yang dilakukan meliputi analisis univariat untuk menggambarkan karakteristik subjek, analisis bivariat untuk melihat hubungan antar variabel, analisis multivariat untuk menentukan faktor yang paling berpengaruh, serta analisis odds ratio untuk melihat nilai pengaruh pada variabel yang diteliti.

2.12 Aspek Etika

1. Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin telah menyetujui penelitian ini berdasarkan protokol nomor 184/UN4.6.4.5.31/PP36/2025, dengan persetujuan etik yang diberikan pada tanggal 18 Maret 2025.
2. Sebelum melakukan penelitian, peneliti menjelaskan secara lengkap tentang tujuan, cara penelitian yang akan dilakukan lalu meminta persetujuan dari setiap responden dan meminta persetujuan mendapatkan izin meneliti.
3. Responden yang akan diteliti setuju dan mempunyai hak untuk bertanya dan ikut ataupun menolak untuk mengikuti penelitian ini, tanpa ada paksaan dan rasa takut untuk mengikuti penelitian.
4. Penelitian ini tidak menimbulkan kerugian dan bahaya. Peneliti tidak akan mencantumkan nama penderita (anonim) dan semua data disimpan dengan aman.
5. Semua pemeriksaan yang dilakukan sehubungan dengan penelitian tidak memungut biaya apapun.