

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Candidiasis adalah infeksi yang disebabkan oleh jamur dari genus *Candida*, yang secara alami terdapat sebagai bagian dari flora normal tubuh manusia. Dalam keadaan fisiologis, *Candida* biasanya tidak menimbulkan gangguan, namun perubahan kondisi tertentu seperti melemahnya sistem imun, penggunaan antibiotik jangka panjang, atau gangguan keseimbangan mikrobiota dapat memicu transisinya menjadi patogen. Ketika hal ini terjadi, *Candida* mampu menyebabkan berbagai bentuk infeksi, mulai dari infeksi superfisial hingga infeksi invasif yang mengancam keselamatan pasien. Manifestasi klinis yang umum dijumpai meliputi kandidiasis pada rongga mulut, genital, serta infeksi pada kulit dan kuku. Infeksi pada area permukaan tubuh tersebut dapat berfungsi sebagai titik awal penyebaran yang berpotensi berkembang menjadi bentuk infeksi sistemik, khususnya ketika jamur memasuki sirkulasi darah. Kondisi ini, yang dikenal sebagai kandidemia, merupakan bentuk komplikasi paling serius karena dapat mengenai berbagai organ internal dan berkaitan dengan morbiditas serta mortalitas yang tinggi. Secara global, kejadian kandidiasis mukosa diperkirakan mencapai jutaan kasus setiap tahun, sementara infeksi *Candida* yang bersifat invasif diproyeksikan berjumlah sedikitnya 700.000 kasus. Variasi angka kejadian antar wilayah sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, profil populasi, kapasitas sistem kesehatan, dan kerentanan individu. Pada sejumlah negara, data epidemiologi mengenai bentuk klinis tertentu masih terbatas, namun penelitian menunjukkan bahwa jenis spesies *Candida* yang dominan dapat berbeda sesuai dengan karakteristik populasi dan lokasi isolasinya. Kandidemia merupakan beban kesehatan yang signifikan di fasilitas pelayanan kesehatan, terutama pada pasien dengan kondisi kritis atau gangguan imun. Laporan menunjukkan bahwa tingkat mortalitas kandidemia dapat mencapai 26,6-56,7%, mencerminkan tingkat keparahan infeksi. Secara global, jumlah kasus tahunan diperkirakan melebihi 600.000, yang menandakan urgensi penanganan yang cepat, akurat, serta strategi pencegahan yang efektif (Rhodes et al., 2019).

Infeksi jamur invasif merupakan salah satu masalah serius dalam pelayanan kesehatan modern karena sering muncul sebagai infeksi nosokomial dan berkontribusi pada tingginya angka kematian, yang secara global diperkirakan mencapai lebih dari 1,5 juta kasus setiap tahun. Di antara berbagai jamur patogen, genus *Candida* menjadi perhatian utama. Meskipun *Candida albicans* masih merupakan spesies yang paling sering menyebabkan infeksi, dalam beberapa tahun terakhir terlihat pergeseran epidemiologi ke arah

peningkatan kasus yang disebabkan oleh *Candida non-albicans* (NAC). Spesies NAC termasuk *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, dan *Candida auris*. Semakin banyak ditemukan dalam infeksi klinis. Kenaikan ini dipengaruhi oleh beberapa faktor penting, seperti tingginya paparan antibiotik spektrum luas secara profilaksis, meningkatnya kondisi immunosupresi pada pasien, serta dampak polusi lingkungan yang mendorong penyebaran patogen secara horizontal. Penggunaan antibiotik secara berlebihan, misalnya, dapat mengubah ekosistem mikroba normal sehingga NAC lebih mudah beradaptasi dan menunjukkan resistensi terhadap obat antijamur, terutama golongan azol. Kondisi imunitas yang menurun juga membuka peluang lebih besar bagi kolonisasi dan infeksi jamur. Di antara kelompok NAC, *Candida glabrata* menonjol sebagai patogen oportunistik yang semakin penting. Jamur ini dapat menyebabkan infeksi serius pada berbagai jaringan dan organ, terutama pada pasien dengan penyakit kronis seperti diabetes, kanker, atau mereka yang menerima terapi nutrisi parenteral. Dalam beberapa populasi pasien, *C. glabrata* bahkan dapat menyaingi atau melampaui *C. albicans* sebagai penyebab infeksi aliran darah. Studi epidemiologi terbaru menunjukkan bahwa *C. glabrata* tidak hanya memiliki kecenderungan penyebaran candidemia yang lebih agresif, tetapi juga menunjukkan pola penularan yang bervariasi antar wilayah. Secara global, infeksi nosokomial oleh *C. glabrata* mencapai sekitar 22%, dan resistensinya terhadap flukonazol tercatat sekitar 12%, sehingga mempersulit penatalaksanaan klinis. Di Indonesia, insiden kandidiasis menunjukkan peningkatan dari tahun ke tahun. Kondisi iklim tropis dengan suhu tinggi dan kelembapan yang stabil menciptakan lingkungan yang mendukung pertumbuhan berbagai spesies *Candida*. Beberapa spesies, termasuk *C. glabrata*, memiliki kemampuan bertahan pada salinitas dan suhu tinggi hingga 42°C, sehingga mudah berkembang di daerah beriklim hangat seperti Indonesia. Faktor-faktor ini berkontribusi pada meningkatnya kasus kandidiasis pada populasi umum maupun kelompok rentan. Manajemen kandidiasis meliputi terapi antifungal topikal, oral, atau intravena tergantung pada kondisi klinis pasien. Pada *Candidiasis* invasif, antifungal sistemik seperti *flukonazol*, *caspofungin*, *micafungin*, atau *amfotericin B* digunakan tergantung pada spesies yang terlibat dan tingkat keparahan pasien. Pengobatan untuk pasien kritis berbeda jika infeksi disebabkan oleh *Candida auris* yang resisten terhadap beberapa jenis obat, dengan *echinocandins* seringkali menjadi satu-satunya pilihan terapeutik. (de Tilly, et., all., 2022) Jenis agen antijamur yang akan diberikan bergantung pada spesies *Candida* yang menyebabkan infeksi, identifikasi yang akurat terhadap etiologi pada spesies, serta inisiasi dini terapi antijamur, sangat penting untuk memastikan keberhasilan terapi dan meningkatkan prognosis, sehingga mengurangi tingkat

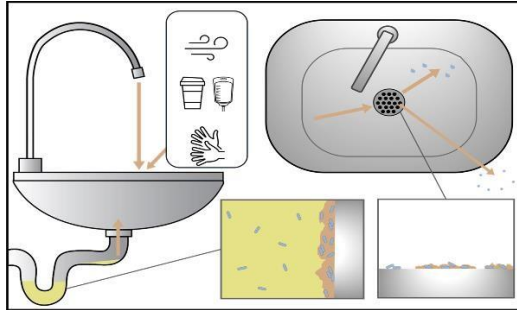
mortalitas yang terkait dengan candidemia dan infeksi serius lainnya. Beberapa kelas agen antijamur yang tersedia untuk pengobatan infeksi *Candida*, seperti *azoles*, *polyenes*, *echinocandins*, namun tingkat mortalitas masih tetap tinggi. Diantara kelompok antijamur ini *azoles* adalah agen antijamur yang paling sering digunakan untuk pengobatan dan pencegahan infeksi jamur. Fluconazole adalah antifungal yang sering digunakan. (Berkow, et., all., 2017). Peningkatan tingkat resistensi fluconazole pada *Candida sp.* telah dilaporkan oleh banyak peneliti, Mekanisme *azoles* sebagai penghambat enzim *14 α -steroldemethylase*, yang dikodekan oleh gen ERG11. Enzim ini bertanggung jawab atas sintesis ergosterol pada membran sel jamur. *azoles* mengganggu sintesis ergosterol. *Candida sp.* dapat mengembangkan resistensi terhadap *azoles* melalui berbagai mekanisme, seperti peningkatan ekspresi *efluks pump* (dikode oleh gen MDR1, CDR1, dan CDR2), pengembangan jalur alternatif untuk sintesis ergosterol, atau perubahan genetik dan peningkatan ekspresi gen ERG11 (Bohner, et., all., 2022). Mutasi dan overekspresi ERG11 terutama menyebabkan resistensi azol pada *Candida albicans* (Vitiello, et all., 2023).

Beberapa teknik pemeriksaan telah dikembangkan selama lima dekade terakhir untuk mengidentifikasi *Candida* pada spesimen klinis. Pemeriksaan yang dilakukan antara lain *germ tube test*, *chromogenic test*, uji enzimatik, uji imunologi (identifikasi antigen atau antibodi) dan uji fermentasi. Pemeriksaan ini ternyata tidak cukup sensitif untuk memberikan hasil yang akurat, sehingga terlambat dalam memulai terapi antijamur (Smith et al., 2019).

Lingkungan medis merupakan tempat patogen oportunistik, yang dapat ditularkan ke individu melalui berbagai cara. Penularan terhadap infeksi jamur yang didapatkan dirumah sakit bervariasi sesuai dengan patogen yang terlibat. Sebagian besar infeksi *Candida spp* berasal dari endogen, namun infeksi silang dapat ditularkan melalui kontak dengan petugas Kesehatan di rumah sakit, atau bahkan peralatan medis di rumah sakit. Saluran air limbah merupakan lingkungan mendukung untuk pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan biofilm (Kizni, et all., 2017).

Dalam beberapa tahun terakhir, sejumlah wabah telah dikaitkan dengan wastafel yang terkontaminasi. Organisme yang mengkolonisasi saluran pembuangan wastafel dapat tersebar dari saringan ke mangkuk wastafel dan permukaan meja melalui percikan air yang mengalir. Wabah biasanya melibatkan bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas sp* dan *Enterobacteriaceae* yang resisten terhadap karbapenem (CDC. 2024). Desain wastafel menentukan risiko penyebaran kolonisasi mikroorganisme.

Misalnya, penempatan keran sedemikian rupa sehingga air mengalir langsung ke saluran pembuangan dapat meningkatkan risiko penyebaran organisme. Desain wastafel yang digunakan di rumah sakit dan kecenderungan untuk menyebarkan patogen masih terbatas. Infeksi yang didapat di fasilitas kesehatan didapatkan oleh satu dari setiap 31 pasien di Amerika Serikat. Saluran pembuangan wastafel rumah sakit diketahui sebagai reservoir patogen yang menyebabkannya, dan terdapat bukti transfer dua arah mikroorganisme ini antara wastafel dan pasien (Magill SS, et., all., 2023) (Buchan BW, et., all. 2019). Mekanisme penularan dari saluran pembuangan wastafel ke pasien dapat mengidentifikasi bagaimana manajemen untuk intervensi. Untuk berpindah dari saluran pembuangan ke pasien, pertama mikroorganisme dapat berpindah dari *p-traps* dan biofilm saluran pembuangan hingga ke penutup saluran pembuangan dan bak wastafel (Gambar 1). Selanjutnya, mikroorganisme menyebar ke permukaan sekitar dan ke pasien melalui penyebaran droplet saat wastafel digunakan dan air mengenai penutup saluran pembuangan yang terkontaminasi atau bak wastafel. Salah satu pendekatan untuk mengendalikan paparan bakteri saluran pembuangan adalah dengan menargetkan saluran pembuangan secara langsung. Namun, pendekatan ini seringkali tidak efektif karena tidak ada praktik standar untuk pembersihan atau desinfeksi saluran pembuangan dan biofilm yang tumbuh kembali dengan cepat bahkan setelah penggantian total sistem perpipaan. Patogen dapat ditularkan dari saluran pembuangan ke pasien secara langsung melalui kontaminasi tangan tenaga kesehatan atau secara tidak langsung melalui kontaminasi permukaan ruangan dan peralatan yang berdekatan. Penelitian sebelumnya secara *in vitro* Studi menunjukkan bahwa patogen tumbuh menuju saringan wastafel dari perangkap P yang terkontaminasi dengan kecepatan $\sim 2,5$ cm (1 inci) per hari. Pembersihan permukaan wastafel untuk menghentikan penularan merupakan praktik yang lebih umum. Mikroorganisme pada permukaan wastafel (misalnya, penutup saluran pembuangan dan bak wastafel) paling mungkin menyebar ke pasien, Selain migrasi ke atas dari saluran pembuangan, mikroorganisme juga dapat menempati permukaan wastafel dari sumber lain, termasuk air keran, endapan dari udara dalam ruangan, atau penularan dari mikrobioma manusia selama mencuci tangan dan penggunaan wastafel lainnya (Gambar 1). (Pawluk E, et., all., 2024)



Gambar 1. Desain Pipa Wastafel dan Mekanisme Penularan dari Mikroorganisme yang berasal dari wastafel (Pawluk E, et., all., 2024)

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka masalah penelitian ini adalah: “Apakah terdapat Gen *Multi drug resistant* (MDR) *Candida sp* pada wastafel diruangan tindakan di seluruh Rumah Sakit di Kota Kendari?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui distribusi dan proporsi kontaminasi spesies *Candida sp* pada wastafel diruangan tindakan seluruh Rumah Sakit di Kota Kendari

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui distribusi kontaminasi Jamur *Candida sp* di seluruh Rumah Sakit Kota Kendari
2. Untuk mengetahui Proporsi Jamur *Candida sp* yang bersifat *Multi Drug Resistant* (MDR) pada fasilitas yang terdapat pada ruangan tindakan di seluruh Rumah Sakit Kota Kendari

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang infeksi spesies *Candida* di Kota Kendari.

2. Manfaat Praktis

Bagi Instansi Kesehatan: Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi instansi penyedia layanan

kesehatan tentang kemungkinan infeksi *Multi Drug Resistant* MDR disebabkan oleh spesies *Candida*. Dengan demikian bisa dibuat kebijakan preventif dan diagnosis laboratorium secara molekular selain dengan cara diagnosis konvensional.

Bagi peneliti: Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengalaman meneliti dan menulis bagi peneliti dan sebagai rujukan bagi peneliti lain untuk melakukan penelitian selanjutnya.

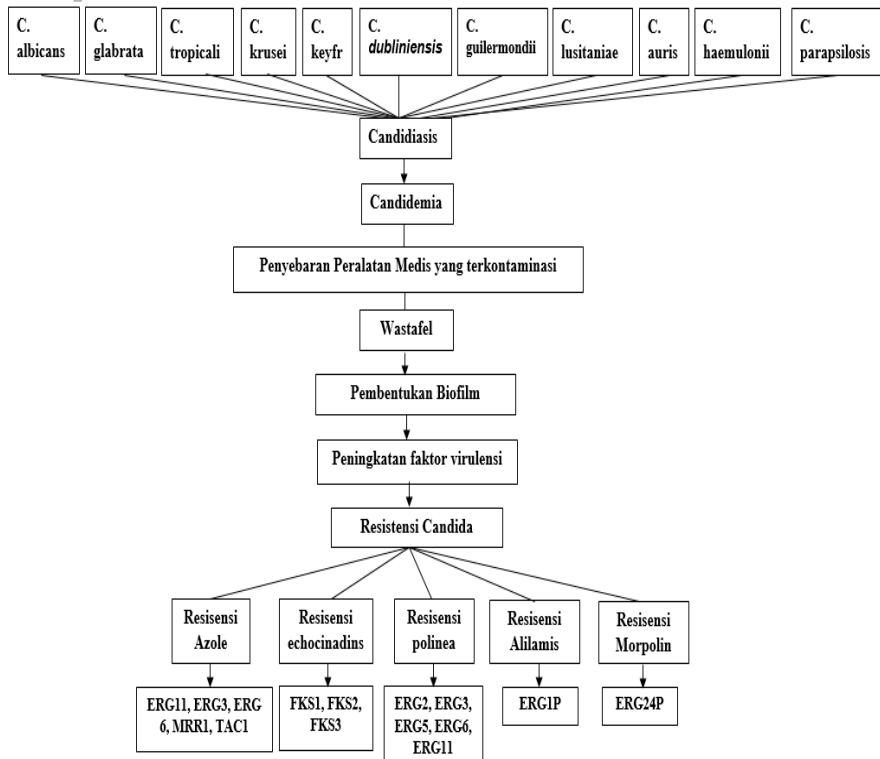
Bagi perguruan tinggi: sebagai sumbangsih pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK).

1.5 Orisinalitas dan Kebaharuan Penelitian

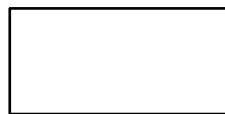
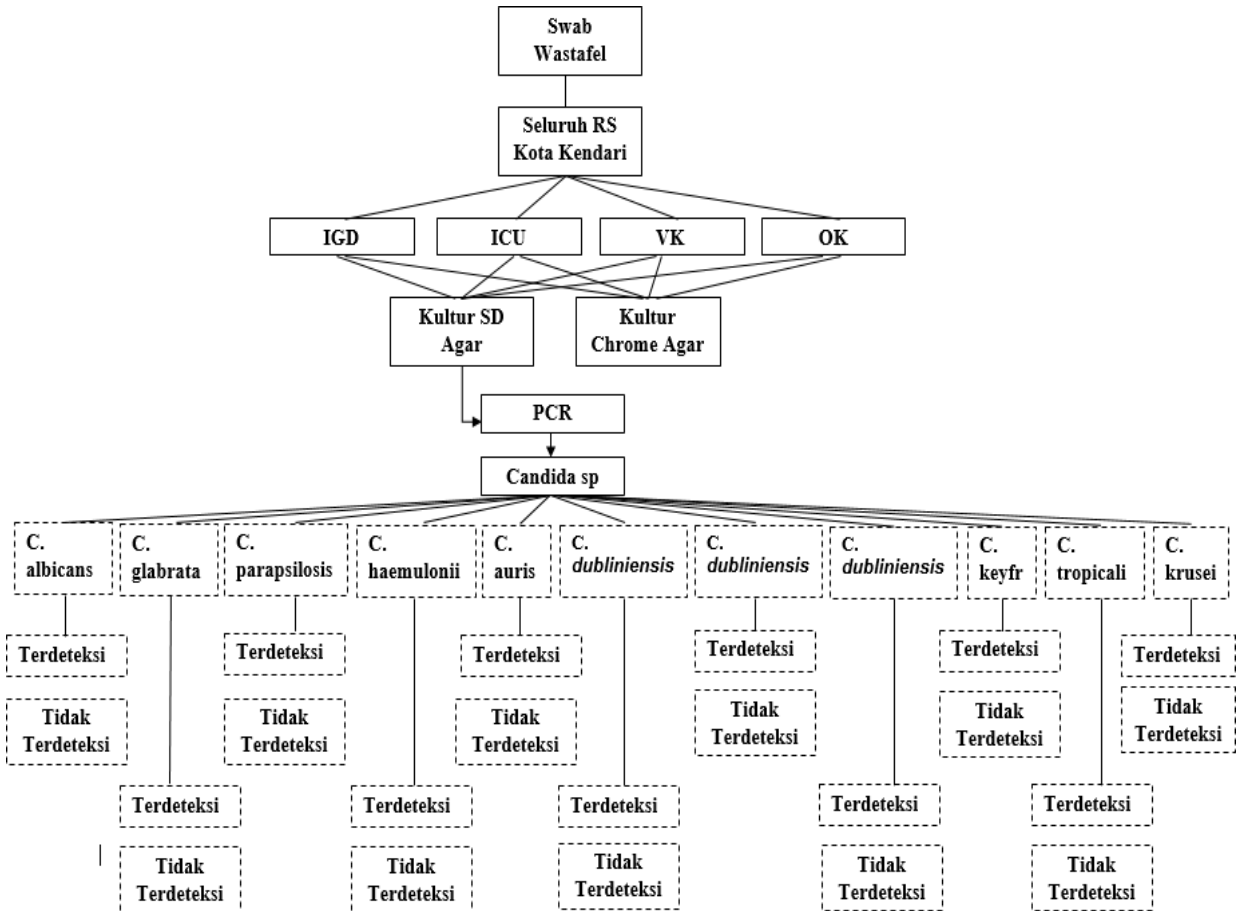
1.5.1 Penelitian tentang adanya gen resistensi dari spesies *candida* pada wastafel rumah sakit masih cukup jarang dilakukan di Indonesia terutama pada Kota Kendari Sulawesi Tenggara

1.5.2 Menghasilkan data terkait proporsi pola genetik dari spesies *candida* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada wastafel di seluruh Rumah Sakit Kota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Konsep



Variabel dependen



Variabel independen

BAB II METODE PENELITIAN

1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskriptif observatif dengan pendekatan cross sectional menggunakan data primer. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan menguji wastafel di ruangan tindakan khususnya ruangan IGD, ruangan ICU, ruangan VK dan ruangan OK untuk mengetahui adanya Gen Resistensi

1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

- Pengambilan sampel dilakukan dengan cara swab pada fasilitas wastafel di ruangan tindakan seluruh Rumah Sakit di Kota Kendari pada ruangan IGD, ruangan ICU, ruangan VK dan ruangan OK
- Identifikasi molekuler untuk mendeteksi MDRO *Candida* sp. dilakukan di Laboratorium Departemen Mikrobiologi, FK-UNHAS.

1.3 Populasi dan Subyek Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah semua sampel swab wastafel yang diambil di seluruh fasilitas wastafel di Rumah Sakit Kota Kendari.

2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah semua sampel swab yang diambil dari fasilitas wastafel di Rumah Sakit Kota Kendari, yang memenuhi kriteria subyek penelitian.

1.4 Kriteria Subyek Penelitian

1. Kriteria Inklusi Subyek Penelitian

- Sampel swab wastafel yang diambil di ruangan IGD, ruang ICU, ruang OK di rumah sakit
- Wastafel ruang tindakan yang secara rutin digunakan minimal sekali sehari

2. Kriteria Eksklusi

- Wastafel tidak pernah digunakan
- Wastafel pernah digunakan untuk membuang sampah
- Wastafel yang tidak memiliki sumber air mengalir.

1.5 Alat dan Bahan

a. Alat :

- Mesin PCR (Biorad),
- Gel DOC,
- Mesin Elektroforesis,
- Sentrifuge,
- Inkubator Sheker
- Laminal Flow,
- BSCTipell,
- Mikropipet(1000 ul,100ul,20ul,10ul),
- Cetakan Agarosa,
- Tips (1000 ul,100 ul,20 ul,10 ul),
- Tabung efendorf,
- Tabung PCR,
- Erlenmeyer,
- GelasUkur,

b. Bahan :

- Sampel
- Primer
Urutan Primer :
- Set 1
- *C.albican* (665 bp)
Forward CABF 59 : TTGAACATCTCCAGTTTCAAAGGT
Reverse CADBR 125 : AGCTAAATTCATAGCAGAAAGC
- *C.parasilopsis* 1 (837 bp)
Forward CPPIF41 : TGACAATATGACAAAGGTTGGTA
Reverse CPPIR122 : TGTCAAGATCAACGTACATTTAGT
- *C.parasilopsis* II (310 bp)
Forward CPPIIF41 : GGACAACATGACAAAAGTTCGGCA
Reverse CPPIIR69 : TTGTGGTGTAAATTCTTGGGAG
- *C. guilliermondii* (205 bp)
Forward CGLF41 : CCCAAAATCACAAAGCTCAAGT
Reverse CGLR61 : TACGACTTGAAGTTGCGAATTG
- Set 2
- *C. dubliniensis* (816 bp)
Forward CDBF28 : AAATGGGTTTGGTGCCAAATTA
Reverse CDBR110 : GTTGGCATTGGCAATAGCTCTA
- *C. glabrata* (674 bp)

Forward CGBF35 : CCCAAAAATGGCCGTAAGTATG
Reverse CGBR103 : ATAGTCGCTACTAATATCACACC

- *C. kefyr* (532 bp)
Forward CKFF35 : CTTCCAAAGGTCAGAAGTATGTCC
Reverse CKFR85 : CTTCAAACGGTCTGAAACCT
 - *C. krusei* (227 bp)
Forward CKSF35 : GAGCCACGGTAAAGAATACACA
Reverse CKSR57 : (5-TTTAAAGTGACCCGGATACC-3)
 - Set 3
 - *C.tropicalis* 1 (318 bp)
Forward CTPIF36 : GTTGTACAAGCAGACATGGACTG
Reverse CTPIR68 : CAAGGTGCCGTCTTCGGCTAAT
 - *C.tropicalis* 2 (860 bp)
Forward CTPIF36 : CTGGGAAATTATATAAGCAAGTT
Reverse CTPIR121 : TCAATGTACAATTATGACCGAGTT
 - *C. lusitaniae* (799 bp)
Forward CLTF39 : CATGTCGAAATGCAACCCCCCG
Reverse CLTR119 : GCGTACACTTGTGGCCATCTTTA
- Enzim PCR (Go Taq Master Mix),
 - RNase Free water,
 - Agarosa,
 - Ethidium Bromida,
 - TBE 0,5
 - Loading Dey,
 - DNA Leader / Marker (100 bp),

2.6. Prosedur Penelitian

1. Cara pengambilan swab wastafel

a. Swab medium transport amies.

- Wastafel ; Mencari wastafel yang biasa/rutin digunakan setelah melakukan tindakan medis terhadap pasien dan di tempat mencuci alat medis yang sudah digunakan.
- Setelah memastikan wastafel yang akan diambil spesimennya. Kemudian wastafel disiram dengan zat pewarna makanan, dan di bilas dengan air, bagian yang mempunyai plak (menahan warna) di dinding dan di drain Kemudian di swab dengan menggunakan medium transport amies, dengan cara dimasukkan ke dalam bagian drain wastafel kurang lebih 10-15 cm dan digosok di sisi wastafel. Setelah itu swab tersebut dimasukkan di medium Amies.

2. Transportasi dan Penyimpanan Sampel

Pengambilan sampel, sampel segera dibawa ke laboratorium. Selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20C sampai dilakukan pemeriksaan multiplex PCR.

3. Prosedur Kerja Laboratorium

a. Ekstraksi DNA

1. Masukkan Sampel 200 ul (Isolat dlm PBS) kedalam tabung ZR Bashingbead Lysis Tube tambahkan 750 ul Bashingbead Buffe inkubasi selama \geq 5 menit Cell Lysis kemudian sentrifuge 10.000 selama 1 menit
2. Transfer sebanyak 400 ul supernatant kedalam tabung Zymo-spin Ill-F Filter didalam tabung ependorf 1,5 ml kemudian sentrifuge 8.000 selama 1 menit
3. Tambahkan 1.200 ul larutan Genomic Lysis Buffer
4. Transfer sebanyak 800 ul kedalam tabung Zymo-spin IICR Column dalam Collection tube, sentrifuge 10.000 selama 1 menit
5. Buang cairan pd tabung collection tube dan ulangi prosedur no.4
6. Tambahkan 200 ul DNA Pre-Wash Buffer ke dalam tabung Zymo-spin IICR Column dalam Collection tube, sentrifuge 10.000 selama 1 menit
7. Tambahkan 500 ul g-DNA Pre-Wash Buffer ke dalam tabung Zymo-spin IICR Column dalam Collection tube, sentrifuge 10.000 selama 1 menit
8. Pindahkan tabung Zymo-spin IICR Column ke tabung ependorf baru dan tambahkan 100 ul larutan DNA Elution Buffer, sentrifuge 10.000 selama 1 menit
9. Buang tabung Zymo-spin IICR Column, cairan yg terdapat pada tabung ependorf Adalah DNA yang siap utk di PCR

b. Mix PCR

Set 1

Go Taq Master Mix	: 25 ul
Primer Forward CABF 59	: 1 ul
Primer Reverse CADBR 125	: 1 ul
Primer Forward CPPIF41	: 1 ul
Primer Reverse CPPIR122	: 1 ul
Primer Forward CPPIF41	: 1 ul
Primer Reverse Reverse CPPIR69	: 1 ul
Primer Forward CGLF41	: 1 ul
Primer Reverse CGLR61	: 1 ul
Nuclesa Free Water	: 7 ul

	DNA Sampel	: 10 ul
	Total	: 50 ul
Set 2		
	Go Taq Master Mix	: 25 ul
	Primer Forward CDBF28	: 1 ul
	Primer Reverse CDBR110	: 1 ul
	Primer Forwar CGBF35	: 1 ul
	Primer Reverse CGBR103	: 1 ul
	Primer Forward CKFF35	: 1 ul
	Primer Reverse CKFR85	: 1 ul
	Primer Forward CKSF35	: 1 ul
	Primer Reverse CKSR57	: 1 ul
	Nuclesa Free Water	: 7 ul
	DNA Sampel	: 10 ul
	Total	: 50 ul
Set 3		
	Go Taq Master Mix	: 25 ul
	Primer Forward Forward CTPIF36	: 1 ul
	Primer Reverse CTPIR68	: 1 ul
	Primer Forward CTPIF36	: 1 ul
	Primer Reverse CTPIIR121	: 1 ul
	Primer Reverse <i>Forward</i> CLTF39	: 1 ul
	Primer <i>Reverse</i> CLTR119	: 1 ul
	Nuclesa Free Water	: 9 ul
	DNA Sampel	: 10 ul
Total		: 50 ul

c. Running PCR

Set 1, Set 2 dan Set 3 (*Candida* spp)

- Cycle 1 sebanyak 1x Suhu 95 °C selama 5 Menit (Pre-Denaturasi)
- Cycle 2 sebanyak x 35Siklus
 - Step 1 Suhu 95 °C selama 30 detik(Proses Denaturasi)
 - Step 2 Suhu 57 °C selama 30 detik(Proses Aneling)
 - Step 3 Suhu 72 °C selama 1 menit (Proses extension)
- Cycle 3 sebanyak 1x suhu 72 °C selama 2 menit (Final extension)

d. Gel Elektroforesis

1. Buat gel

- Ditimbang 2gr agarose dan dilarut kandalam 100 ml TBE Buffer 0,5x untuk mendapatkan larutan agarose 2 %
- Campuran agarose dan TBE Buffer 0,5x dipanaskan hingga larut kemudian ditunggu hingga agak dingin kemudian ditambah 10 μ l Ethidium Bromida 1%
- Larutan agarose dituang kedalam cetakan dan ditunggu hingga beku.

2. Pembuatan DNA Marker

- Sebanyak 25 μ l DNA 100 bp ladder dimasukkan kedalam tube berisi 1 ml Blue Juice Loading Dye, dan dicampur untuk marker
- Laber tube dicopot dan diganti menjadi marker

3. Persiapan Running Elektroforesis

- Gel yang telah beku dimasukkan kedalam alat elektroforesis dan direndam dalam larutan TBE 0,5x
- Sebanyak 20 μ l amplicon hasil PCR (Kontrol Positif, Kontrol Negative, sampel) ditambah dengan 2 μ l Blue Juice Loading Dye (tanpa marker), dicampur dan dimasukkan kedalam sumur-sumur gel
- Pada Sumur pertama tambahkan 6 ul DNA leader 100 bp di dekat control positif.

4. Running Elektroforesis

- Elektroforesis dihidupkan dan dijalankan dari muatan negative (katode) ke muatan positif (anode) pada 100 A dan 150 menit
- Setelah elektroforesis dilihat pita yang terbentuk. Apabila pita sejajar dengan control positif berarti hasil positif.

5. Prosedur Kerja Gel Doc

Cara menggunakan alat Gel Doc dibagi menjadi 4 tahap, yaitu :

- Menyalakan Alat Gel Doc
- Mengatur posisi gel
- Mengatur gambar
- Save dan Print gambar

6. Dilakukan pengaturan Image

- Setelah pengaturan gel selesai, tombol Trans UV (On) ditekan. Pada kondisi ini, lampu UV akan mati secara otomatis apabila pintu dibuka kecuali tombol

Hold ditekan.

- Pilih Auto Expose apabila gambar ingin diambil secara otomatis atau pilih Manual expose apabila ingin gambar ingin diambil secara manual dengan menaikkan atau menurunkan waktu paparan (Exposure Time).
- Apabila gambar yang diinginkan sudah terlihat dengan baik dan jelas, Freeze diklik.
- Annotate dipilih untuk memberikan tulisan pada gambar.
- Gambar Disimpan dan Dicitak, Setelah selesai di edit, kemudian gambar dapat di simpan dan kemudian klik cetak untuk mendapatkan hasil dalam bentuk foto gel.

2.7 Pengolahan dan Analisa Data

Setelah data terkumpul peneliti memeriksa kembali kebenaran data yang telah terkumpul. Data hasil penelitian akan diolah menggunakan program Microsoft excel. Data yang sudah diolah kemudian diolah secara deskriptif sederhana, kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

2.8 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini tidak mempunyai masalah pelanggaran etika penelitian, karena:

1. Mendapat rekomendasi etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Unhas
2. Penelitian ini mendapat izin dari Kepala Dinas Kesehatan Kota Kendari.
3. Semua informasi yang dirujuk disertai sitasi penulis dan tahun terbit referensi.