

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endophthalmitis adalah infeksi pada jaringan dan cairan intraokuler yang berpotensi mengancam penglihatan. Pada sebagian besar pasien, endophthalmitis mengakibatkan hilangnya penglihatan ireversibel pada mata yang terkena; pada beberapa pasien lainnya, semua fungsi penglihatan pada mata tersebut hilang. Istilah "endophthalmitis" hamper selalu digunakan untuk mendeskripsikan infeksi intraokular akibat bakteri atau jamur yang melibatkan vitreous dan/atau aqueous. Kasus inflamasi intraokular akibat virus, parasit, dan etiologi non infeksi biasanya diklasifikasikan sebagai uveitis daripada endophthalmitis. (Chiquet et al., 2008; Melo et al., 2011; Mishra et al., 2019; Mitra et al., 2021; Sjoholm-Gomez de Liano et al., 2017; Vedantham et al., 2006)

Sebagian besar kasus endophthalmitis bersifat eksogen, Ketika infeksi masuk ke mata "dari luar ke dalam". Penyebab paling sering dari endophthalmitis eksogen adalah operasi mata, injeksi intravitreal, dan trauma oculus penetrans. Pasien dengan endophthalmitis eksogen biasanya mengalami penurunan penglihatan dengan cepat dan rasa ketidaknyamanan mata atau nyeri mata dalam beberapa hari setelah kejadian tersebut. Tanda-tanda infeksi sistemik, seperti demam dan leukositosis, tidak ditemukan pada kasus ini. (Jayasudha et al., 2014; Kosacki et al., 2020; Mitra et al., 2021; Ranjan et al., 2021; Vedantham et al., 2006)

Endophthalmitis endogen terjadi akibat penyebaran ke mata selama kondisi bakteremia atau fungemia. Beberapa pasien datang terutama dengan gejala mata dan tanpa tanda-tanda infeksi sistemik, seperti pasien dengan fungemia atau bakteremia transien akibat penyalahgunaan obat intravena. Lainnya, seperti kasus endokarditis, biasanya memiliki manifestasi tanda-tanda infeksi sistemik dan bahkan dapat menunjukkan gejala mata setelah pengobatan dimulai untuk infeksi sistemik yang mendasarinya. (Jayasudha et al., 2014; Muda et al., 2018; Regan et al., 2020)

Kemampuan untuk mengidentifikasi organisme penyebab mempunyai implikasi besar dalam pengobatan dan manajemen klinis pasien. Hasil kultur positif yang bervariasi sekitar 38-44% pada kasus endophthalmitis yang didiagnosis secara klinis telah diketahui dan telah dilaporkan pada subjek di India. Oleh karena itu agen etiologinya tidak diketahui pada sebagian besar pasien, ketika kultur bakteri aerobik rutin menunjukkan hasil negatif. Hasil kultur yang negatif dapat dikaitkan dengan sifat *fastidious* dari mikroorganisme penyebab yang mungkin sulit untuk tumbuh dengan metode kultur atau mungkin tidak dapat dikultur. Meskipun hasil yang rendah dan ketidakmampuan patogen tertentu untuk tumbuh pada media rutin, kultur mikrobiologi masih menjadi standar emas saat ini untuk diagnosis sebagian besar infeksi intraokular. Namun, penggunaan metode deteksi berbasis molekuler seperti PCR telah meningkatkan hasil deteksi selain mengurangi waktu untuk membuat diagnosis konfirmasi (Chiquet et al., 2007; Kosacki et al., 2020).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil bakteri pada penderita endophthalmitis dengan metode molekuler di Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar, Indonesia.

1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.2.1 Tujuan Umum

Untuk mendeteksi profil bakteri aerob secara molekuler pada penderita endophthalmitis di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

1.2.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui proporsi temuan bakteri aerob yang dideteksi menggunakan metode molekuler.

1.2.3 Manfaat untuk Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang profil bakteri penyebab endophthalmitis di Makassar.

1.2.4 Manfaat untuk Instansi Kesehatan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi instansi penyedia layanan kesehatan tentang kemungkinan endophthalmitis disebabkan oleh bakteri aerob. Dengan demikian bisa dibuat kebijakan diagnosis laboratorium secara molekuler selain dengan cara diagnosis konvensional pada penderita endophthalmitis.

1.2.5 Manfaat untuk Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengalaman meneliti dan menulis bagi peneliti.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

2.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Mei 2023 hingga April 2024 dalam kurun waktu 12 bulan.

2.1.2 Tempat Penelitian

1. Pengambilan spesimen cairan intraokular dilakukan di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar pada penderita endophthalmitis.
2. Identifikasi mikrobiologi/kultur dan molekular bakteri aerob dari cairan intraokular dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Mikrobiologi FK UNHAS.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat Penelitian

- Mesin PCR (Biorad)
- Gel DOC
- Mesin Elektroforesis
- Sentrifuge
- Waterbath
- Laminar Flow
- BSCTipell
- Mikropipet (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)
- Cetakan Agarosa
- Erlenmeyer
- Gelas Ukur

2.2.2 Bahan Penelitian

- Sampel
- Primer
 - Forward 63f: 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3
 - Reverse 138r: 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3
- Enzim PCR (Go Taq Master Mix Green)
- RNase Free water
- Agarosa
- Ethidium Bromida
- TBE 0,5
- DNA Leader / Marker (100 bp)
- Tabung eppendorf
- Tabung PCR
- Tips (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskriptif observatif dengan pendekatan *cross sectional* menggunakan data primer dan sekunder. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil bakteri yang teridentifikasi pada cairan intraokular penderita Endophthalmitis dengan metode molekuler di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan data dilakukan setelah mendapatkan rekomendasi etik dalam kurun waktu 12 bulan.

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah semua penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar dan diperiksa cairan intraokularnya di laboratorium Mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

2.3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah semua cairan intraokular yang diambil dari penderita endophthalmitis yang diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin, Makassar, yang memenuhi kriteria subyek penelitian.

2.3.2.1 Kriteria Inklusi Subyek Penelitian

1. Cairan intraokular yang diambil dari penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Penderita atau wali penderita setuju atau menyetujui keluarganya ikut penelitian ini.

2.3.2.2 Kriteria Eksklusi Subyek Penelitian

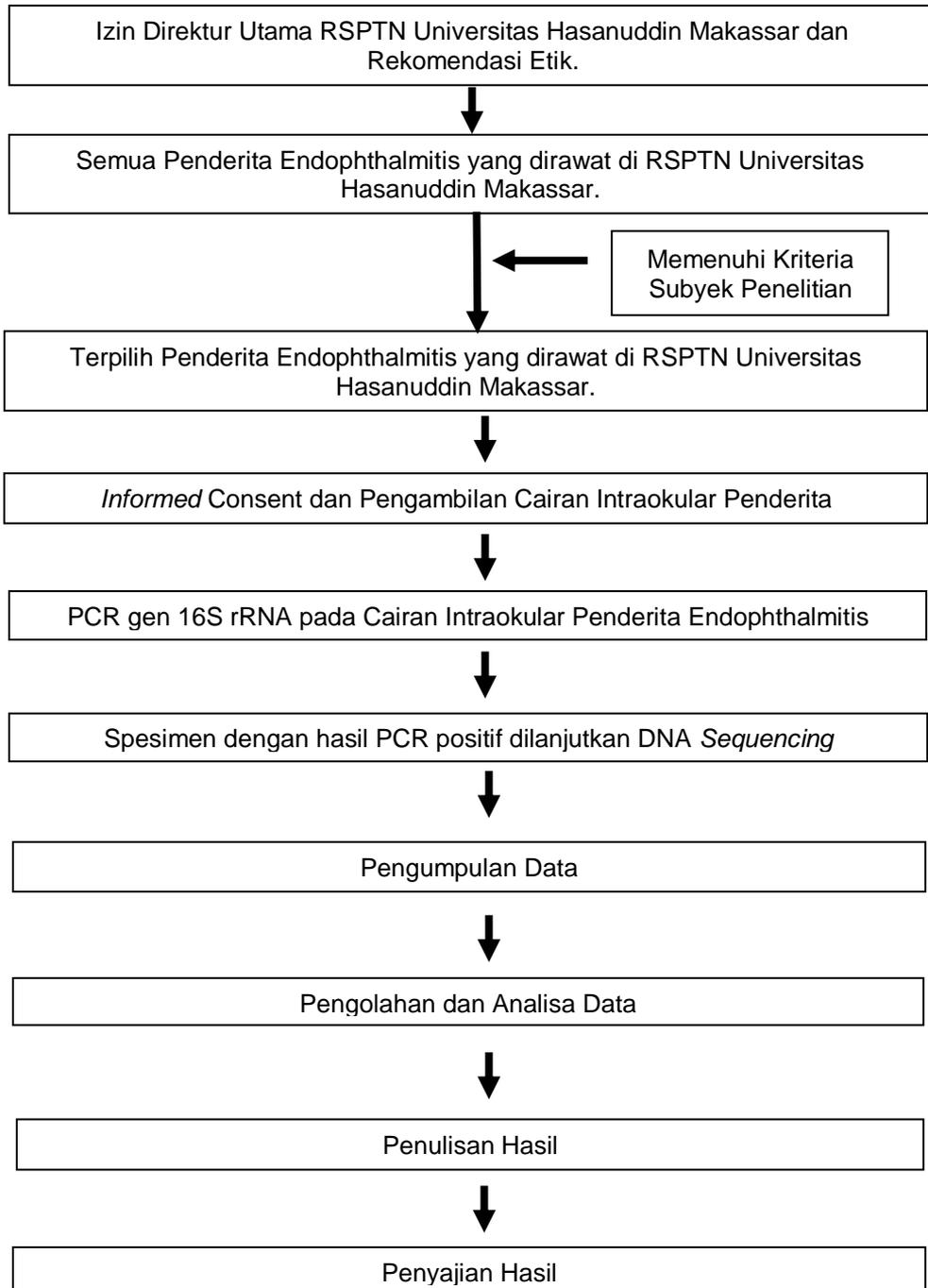
1. Penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar yang cairan intraokularnya terkontaminasi.
2. Penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar yang cairan intraokularnya rusak.

2.3.3 Jumlah Subyek Penelitian

Besar subyek penelitian ditentukan berdasarkan spesimen cairan intraokular yang didapatkan dari penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar dalam kurun waktu periode 12 bulan dari Mei 2023 hingga April 2024.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Alur Penelitian



Gambar 2.1 Pelaksanaan Penelitian

2.4.2 Prosedur Penelitian

2.4.2.1 *Informed Consent*, Pengambilan, Pengiriman dan Penyimpanan

Spesimen

Persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*) akan diminta sebelum memulai pengambilan cairan intraokular. Setelah mendapat persetujuan dan tanda tangan dari penderita untuk ikut dalam penelitian, dilakukan pengambilan cairan intraokular dari penderita. *Informed consent* dan pengambilan spesimen cairan intraokular penderita endophthalmitis dilakukan oleh dokter spesialis mata. Cairan intraokular segera di kirim ke Laboratorium Mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin dalam wadah steril sesaat setelah diambil pada saat intraoperasi. Bila spesimen tidak langsung diproses, spesimen disimpan pada kulkas suhu – 20°C.

2.4.2.1 Pemeriksaan Molekuler

A. DNA Extraction

1. Preparasi Sampel

Masukkan 200 μ l sampel Cairan Tubuh kedalam tabung ependorf 1,5 ml (Jika volume sampel tdk cukup bisa ditambahkan Larutan PBS hingga volumenya 200 μ l) Tambahkan 20 μ l Proteinase-K lalu mix. inkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit

2. Cell Lysis

Tambahkan 200 μ l GSB Buffer vortex, inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit dimana tiap 5 menit divortex.

3. DNA Binding

Tambahkan 200 μ l Ethanol vortex selama 10 detik. Masukkan kedalam GS Column dalam 2 ml collection Tube. Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 1 menit buang cairan pada collection tube

4. Wash

Tambahkan 400 μ l W1 Buffer, Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. Buang cairan pada collection tube. Tambahkan 600 μ l Wash Buffer Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. Ganti collection tube dengan yang baru, sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 3 menit

5. Elution

Pindahkan GS Column ke tabung ependorf steril, tambahkan 100 μ l Elution Buffer yang sebelumnya telah dipanaskan. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik

6. Buang GS Column. Cairan yang terdapat pada tabung ependorf merupakan DNA produk yang siap untuk di PCR.

B. Mix PCR

Set 1

Go Taq Master Mix	: 25 ul
Primer Forward 63f 10UM	: 1 ul
Primer Reverse 1387r 10UM	: 1 ul
Nuclease Free Water	: 13 ul
DNA Sampel	: 10 ul
Total	: 50 ul

C. Running PCR

Set 1

- Cycle 1 sebanyak 1x Suhu 95°C selama 2 Menit (Pre-Denaturasi)
- Cycle 2 sebanyak x 25 Siklus
 - Step 1 Suhu 95°C selama 30 detik (Proses Denaturasi)
 - Step 2 Suhu 55°C selama 30 detik (Proses Annealing)
 - Step 3 Suhu 72°C selama 1 menit (Proses Extension)
- Cycle 3 sebanyak 1x suhu 72°C selama 10 menit (Final Extension)

D. Gel Elektroforesis

1. Pembuatan gel agarose

- Ditimbang 2gr agarose dan dilarutkan dalam 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 5µl Ethidium Bromida.
- Larutan agar ose dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga beku.

2. Pembuatan DNA Marker

- Sebanyak 25 µl DNA 100 bp ladder dimasukkan ke dalam tube berisi 1 ml Blue Juice Loading Dye, dan dicampur untuk marker.
- Label tube dicopot dan diganti menjadi marker.

3. Persiapan Running Elektroforesis

- Gel yang telah beku dimasukkan ke dalam elektroforesis dan direndam dalam larutan TBE 0,5x.
- Sebanyak 8 µl amplicon hasil PCR (Kontrol Positif, Kontrol negative, sampel) ditambah dengan 2 µl Blue Juice Loading Dye (tanpa marker), dicampur dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel sebanyak 10 µl.
- Pada Lubang pertama tambahkan 10 ul DNA leader 100 bp dimasukkan ke dalam sumur di dekat control positif

4. Running Elektroforesis

- Elektroforesis dihidupkan dan dijalankan dari muatan negative (katode) ke muatan positif (anode) pada 100 A dan 60 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 :

1. Menyalakan Alat Gel Doc
 2. Mengatur posisi gel
 3. Mengatur gambar
 4. Save dan Print gambar
6. Menyalakan Alat Gel Doc
1. Nyalakan Gel Doc dengan menekan tombol ON pada bagian belakang sebelah kiri alat
 2. Nyalakan komputer
 3. Buka software Quantity One dengan cara Double Klik pada ikon Quantity One
 4. Pilih Gel Doc XR dari menu File
7. Mengatur Posisi Gel
1. Pintu alat Gel Doc dibuka
 2. Tekan tombol Epi White (On) jika diperlukan/optional
 3. Letakkan Gel pada dibagian tengah kemudian pintu alat ditutup
 4. Iris, zoom, dan focus diatur dengan melihat ke layar monitor pada software Quantity One
 5. Pintu alat dibuka kembali dan posisi gel diatur kembali jika diperlukan
8. Mengatur Image
1. Setelah pengaturan gel selesai, Tekan tombol Trans UV (On). Pada kondisi ini, lampu UV akan mati secara otomatis apabila pintu dibuka kecuali tombol Hold ditekan
 2. Pilih Auto Expose apabila ingin mengambil gambar secara otomatis atau pilih Manual expose apabila ingin mengambil gambar manual dengan menaikkan atau menurunkan waktu exposure (Exposure Time)
 3. Apabila gambar yang diinginkan sudah terlihat dengan baik dan jelas, Klik Freeze
 4. Untuk memberikan tulisan pada gambar, pilih Annotate
9. Save dan Print Gambar
- Setelah selesai di edit, kemudian gambar dapat di save dan kemudian klik Print untuk mendapatkan hasil dalam bentuk fo.

E. Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA

Sekuensing dilakukan dengan piranti Automated DNA Sequencer ABI PRISM 377 (Perkin Elmer Biosystem, USA). Cycle sequencing DNA template dilakukan menggunakan kit BigDye® Ready Reaction Mix (Perkin Elmer Biosystem, USA).

- Campuran cycle sequencing

terdiri atas 1 µl (300-500 ng) DNA template, 3,2 pmol primer, 1 µl DMSO, 6 µl BigDye® Ready Reaction Mix, dan nuclease free water untuk menggenapkan volume menjadi 20 µl.

- Proses cycle sequencing dilakukan pada mesin sequencer dengan kondisi sebagai berikut: pre-PCR pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing atau pelekatan primer (50°C, 30 detik), elongasi atau pemanjangan primer (72 °C, 2 menit), dan post-PCR (72°C, 7 menit) dengan jumlah siklus sebanyak 25 kali.
- Hasil cycle sequencing tersebut selanjutnya dimurnikan dengan metode pengendapan etanol dan natrium asetat (Sambrook dan Russell 2001). Pada metode pemurnian ini campuran hasil cycle sequencing dimasukkan dalam tabung Eppendorf yang berisi 50 µl 95% (v/v) etanol dan 2 µl 3M natrium asetat pH 4.6 lalu divorteks. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, campuran disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 10000 rpm. Dengan hati-hati supernatan dibuang sampai habis menggunakan pipet mikro. Pelet yang tertinggal dicuci dua dengan 70% (v/v) etanol. Untuk menghilangkan sisa-sisa etanol, pelet divakum selama 10 menit. Pelet yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dengan loading buffer dan siap dilarikan pada gel sekuensing. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen data base European Bioinformatics Institute (EBI) BLASTIN 2.0 atau FASTA3 pada situs <http://www.ebi.ac.uk>.

2.4.2.3 Pengumpulan, Pengolahan dan Analisis Data

Sampel cairan intraokular dianalisis dengan mengumpulkan data demografi berupa usia, jenis kelamin, area mata yang terkena, dan cara penularan endoftalmitis. Statistik deskriptif digunakan untuk meringkas demografi pasien, dan hasil. Rata-rata dan standar deviasi dihitung untuk variabel kontinu, dan frekuensi serta persentase dihitung untuk variabel kategorikal.

2.4.2.4 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini tidak mempunyai masalah pelanggaran etika penelitian, karena:

1. Mendapat rekomendasi etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Unhas dengan nomor protokol UH23070533.
2. Penelitian ini mendapat izin dari Direktur Utama RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.
3. Penderita atau wali penderita setuju ikut penelitian dan menyetujui anaknya ikut penelitian setelah mendapat penjelasan lengkap tentang penelitian ini.
4. Semua informasi yang dirujuk disertai sitasi penulis dan tahun terbit referensi.
5. Semua data disajikan secara anonim

2.5 Parameter Pengamatan

2.5.1 Definisi Operasional

2.5.1.1 Cairan Intraokular dari Penderita Endophthalmitis

Cairan intraokular dari penderita endophthalmitis pada penelitian ini adalah cairan intraokular yang diambil dari penderita endophthalmitis yang dikirimkan ke laboratorium mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar untuk dilakukan pemeriksaan mikrobiologi meliputi pewarnaan Gram dan ataupun kultur.

Kriteria obyektif cairan intraokular dari penderita endophthalmitis: Cairan intraokular yang diambil oleh dokter spesialis mata (ophthalmologist) secara steril.

2.5.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 16S rRNA

PCR pada penelitian ini adalah metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri patogen pada penelitian ini, yaitu menggunakan metode PCR, dengan primer 16S rRNA.

Kriteria obyektif PCR :

- a. Ditemukan : bila hasil pemeriksaan cairan intraokular penderita endophthalmitis dengan metode PCR ditemukan gen 16S positif dengan pita DNA 500-1500 bp.
- b. Tidak ditemukan : bila hasil pemeriksaan cairan intraokular penderita endophthalmitis dengan metode PCR negatif gen 16S.

2.5.1.3 Sequencing

Sequencing pada penelitian ini adalah metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi *spesies bakteri* pada penelitian ini.

Kriteria obyektif sequencing :

- a. Positif : bila pemeriksaan sequencing keluar hasilnya berupa spesies bakteri.
- b. Negatif : bila pemeriksaan sequencing tidak keluar hasilnya berupa spesies bakteri.

2.5.1.4 Profil Bakteri

Profil Bakteri pada penelitian ini adalah Bakteri yang teridentifikasi melalui proses PCR 16sRNA dan diidentifikasi dengan metode sequencing dari cairan intraokular penderita endophthalmitis yang dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RS Universitas Hasanuddin Makassar.

Kriteria obyektif profil Bakteri :

- a. Positif : bila pemeriksaan sequencing keluar hasilnya berupa spesies bakteri.
- b. Negatif : bila pemeriksaan sequencing tidak keluar hasilnya berupa spesies bakteri.