

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endophthalmitis adalah peradangan pada struktur mata bagian dalam yang melibatkan *vitreous* dan *aqueous humor* (Haseeb et al. 2021). Endophthalmitis dapat menyebabkan kebutaan yang tidak dapat disembuhkan dalam hitungan jam atau hari setelah timbulnya gejala. Istilah endophthalmitis lebih sering dikaitkan dengan infeksi bakteri atau jamur, sedangkan infeksi virus atau parasit biasanya dikaitkan dengan uveitis (Durand 2017). Berdasarkan cara penularan jamur atau mode transmisinya, endophthalmitis dapat terjadi secara eksogen, yaitu masuknya sumber infeksi dari luar mata (misalnya, trauma atau komplikasi pembedahan), atau endogen, yaitu masuknya sumber infeksi ke dalam mata melalui aliran darah (Durand 2017; Haseeb et al. 2021; Danielescu et al. 2022; Saeedi et al. 2024).

Fungal endophthalmitis (FE) adalah endophthalmitis yang disebabkan oleh jamur, biasanya berupa ragi (*yeast*) atau kapang (*mold*), dengan *Candida albicans* sebagai *yeast* yang paling sering ditemukan dan *Aspergillus sp.* sebagai *mold* yang paling sering ditemukan pada endophthalmitis jamur, dengan gejala yang paling sering ditemukan adalah kehilangan penglihatan yang disertai dengan tanda-tanda peradangan (Haseeb et al. 2021; Danielescu et al. 2022; Saeedi et al. 2024; Das et al. 2022; Ly 2023; Pei et al. 2022). Dibandingkan dengan di Asia, laporan mengenai endophthalmitis jamur lebih jarang ditemukan di Eropa dan Amerika Utara (Das et al. 2022). Prevalensi endophthalmitis jamur, baik secara eksogen maupun endogen, lebih rendah daripada endoftalmitis bakteri, namun, dalam 20 tahun terakhir, kasus endoftalmitis jamur dengan kultur positif meningkat dari 8,6% menjadi 18,6% (Haseeb et al. 2021; Danielescu et al. 2022). Diagnosis yang tertunda dan kesalahan diagnosis dini terjadi pada 16% hingga 63% kasus (Danielescu et al. 2022; Parambil et al. 2021). Hal ini disebabkan karena mendiagnosis etiologi endophthalmitis jamur merupakan hal yang sulit dan membutuhkan waktu yang lama (Haseeb et al. 2021; Durand 2017).

Fungal endophthalmitis didiagnosis dengan pemeriksaan klinis yang komprehensif dan dikonfirmasi dengan kultur mikrobiologi (Haseeb et al. 2021; Danielescu et al. 2022; Saeedi et al. 2024). Meskipun kultur cairan intraokular merupakan standar emas, namun memiliki sensitivitas yang rendah dan membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) (Haseeb et al. 2021; Saeedi et al. 2024; Biswas and Nandi 2008). PCR organisme umum seperti *Candida*, *Fusarium* dan *Aspergillus* memberikan metode yang relatif cepat dalam mendeteksi spesies jamur, bahkan ketika hasil kulturnya negatif (Saeedi et al. 2024; Danielescu et al. 2022; Haseeb et al. 2021; Chun et al. 2022; Biswas and Nandi 2008).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya infeksi jamur *Candida sp.* 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 mengetahui adanya infeksi jamur *Candida sp.* pada penderita endophthalmitis dengan metode molekuler di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

1.2.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui proporsi temuan infeksi jamur *Candida sp.* 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 infeksi spesies *Candida sp.* 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 spesies *Candida sp.* 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 molekular spesies *Candida* dari cairan intraokular dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat Penelitian

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

2.2.2 Bahan Penelitian

- Sampel
- Primer
 - Set 4
 - ITS1 5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3'
 - ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' that
- 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 adanya infeksi jamur *Candida* pada penderita endophthalmitis dengan metode molekuler di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar dan spesies *Candida* yang teridentifikasi pada cairan intraokular. 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

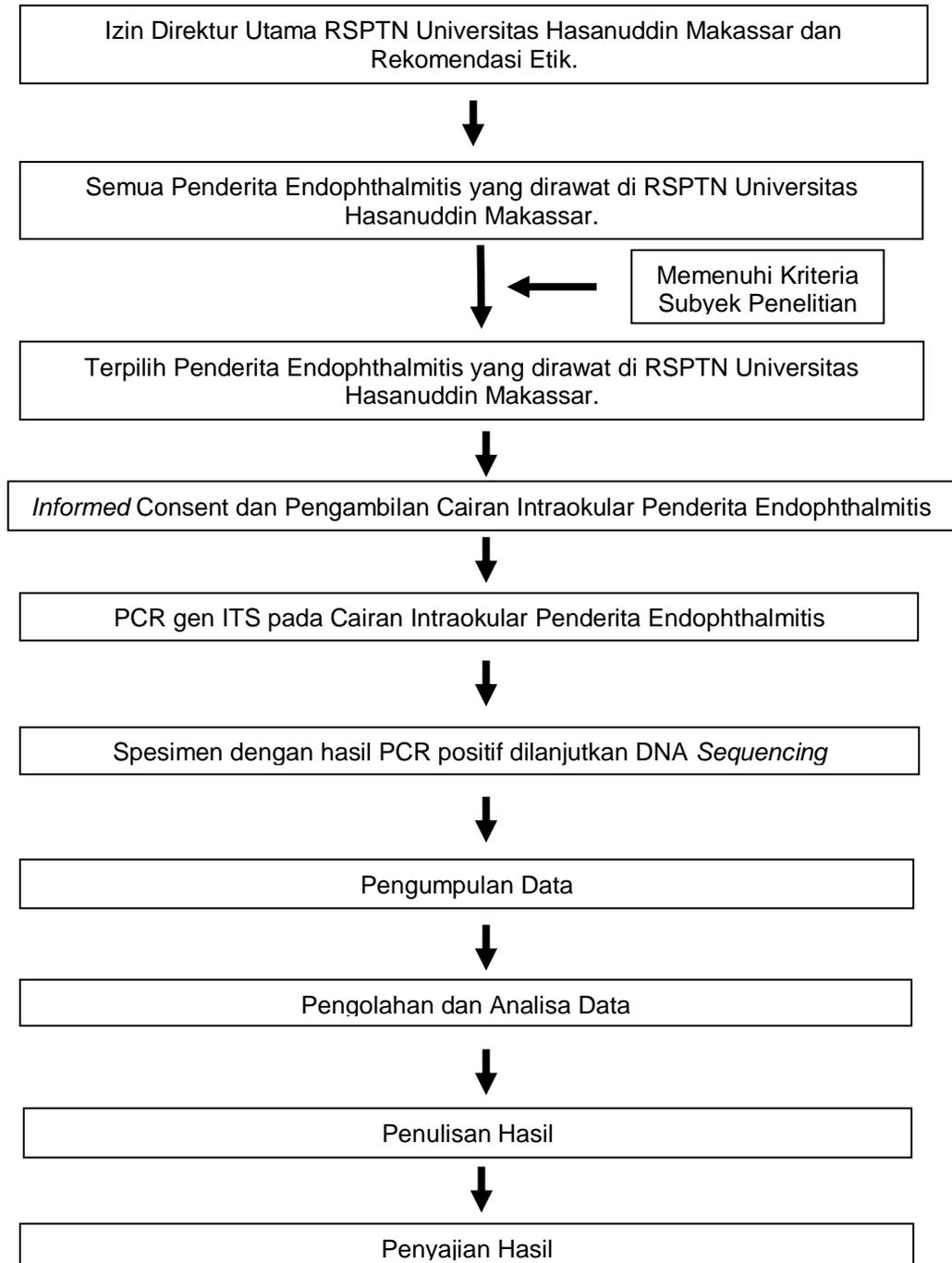
1. Penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar yang cairan intraokularnya terkontaminasi.
2. Penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar yang cairan intraokularnya rusak.

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 selam 1 menit buang cairan pada collection tube

4. Wash

Tambahkan 400 μ l W1 Buffer, Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selam 30 detik. Buang cairan pada collection tube. Tambahkan 600 μ l Wash Buffer Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selam 30 detik. Ganti collection tube dengan yang baru, sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selam 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 selam 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 ITS1	: 1 ul
Primer ITS 4	: 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. Buat gel

- 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 UH23080537.
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 dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar, yang akan digunakan sebagai bahan pemeriksaan untuk identifikasi spesies *Candida* dengan metode multiplex PCR.

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) ITS

PCR pada penelitian ini adalah metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi jamur patogen pada penelitian ini, yaitu menggunakan metode PCR, dengan primer ITS1 5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3' dan ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Fujita et al. 2001; Kumar and Shukla 2005).

Kriteria obyektif PCR :

- a. Ditemukan : bila hasil pemeriksaan cairan intraokular penderita endophthalmitis dengan metode PCR positif.
- b. Tidak ditemukan : bila hasil pemeriksaan cairan intraokular penderita endophthalmitis dengan metode PCR negatif.

2.5.1.3 Sequencing

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

Kriteria obyektif sequencing :

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

2.5.1.4 Profil *Candida sp.*

Profil *Candida sp.* pada penelitian ini adalah spesies *Candida* yang diidentifikasi dengan metode sequencing dari cairan intraokular penderita endophthalmitis yang dirawat di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

Kriteria obyektif profil *Candida sp.* :

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