

**IDENTIFIKASI BAKTERI DI UDARA RUANG PERAWATAN  
INTENSIF RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO  
DENGAN UNIVERSAL PRIMER DAN SEKUENSING**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

ARNIATI SAMAILA

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2013**

**TESIS**

**IDENTIFIKASI BAKTERI DI UDARA RUANG PERAWATAN INTENSIF RUMAH  
SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO DENGAN UNIVERSAL PRIMER DAN  
SEKUENSING**

Disusun dan diajukan oleh

**ARNIATI SAMAILA**

Nomor Pokok P1506211009

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 30 Juli 2013

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Menyetujui**

**Komisi Penasehat,**

Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D  
Ketua

dr. Rizalinda Sjahril, MSc., Ph.D  
Anggota

Ketua Program Studi  
Biomedik,

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D

Direktur Program Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin,

Prof. Dr. Ir. Mursalim

## **PERNYATAAN KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Arniati Samaila  
Nomor mahasiswa : P1506211009  
Program studi : Biomedik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 Juli 2013  
Yang menyatakan

Arniati Samaila

## **PRAKATA**

Alhamdulillah Robbal 'Alamiin, atas nikmat kesehatan, waktu, dan petunjuk-Nya dalam penyelesaian tesis ini. Allah Subhana Wa Ta'ala pemilik ilmu dan waktu, atas ridho-Nya menghadirkan jalan lapang dalam sempitnya waktu penyusunan tesis ini. Dia karuniakan bashirah sehingga selalu ada secercah semangat dalam penyusunan tesis ini. Subhanallah Walhamdulillah Wa Laa Ilaaha Illallah Wallahu Akbar.

Gagasan yang melatari penulisan tesis ini dari pengamatan penulis terhadap kondisi rumah sakit dan infeksi nosokomial yang ditimbulkannya. Sejatinya rumah sakit menjadi sumber kesehatan bagi pasien atau minimal penyakitnya tidak bertambah. Timbulnya penyakit di rumah sakit dapat disebabkan banyak faktor, salah satu faktor yang menjadi perhatian penulis adalah infeksi nosokomial dari udara ruang perawatan intensif. Penulis bermaksud menyumbangkan metode identifikasi bakteri udara ruang rumah sakit.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan tesis ini, namun berkat bantuan berbagai pihak maka tesis ini dapat selesai pada waktunya. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. Nasrum Massi, Ph.D sebagai Ketua Komisi Penasihat dan DR. Rizalinda Sjahril, Ph. D sebagai Anggota Komisi Penasihat atas bantuan dan bimbingannya dalam penyusunan tesis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada pihak Rumah Sakit

Wahidin Sudirohusodo, Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BTKLPP) Kelas I Makassar, Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Lt. 6 (Laboratorium Mikrobiologi) dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar.

Kupersembahkan tesis ini kepada yang tercinta (Alm) Ayahanda Samaila Daeng Tutu dan Ibunda Aisyah Daeng Ngugi yang telah menemaniku mengarungi hidup dan mengantarku meraih semua ini. Terima kasih kepada kakakku Salahuddin, Sabaruddin, Asriani, Samsir, Abidin, Ikhsan, dan adikku Aswar, Idrayana, Idrayani, Muhammad Akhsan, ipar dan keponakan atas dukungan dan motivasinya. Terkhusus kepada ananda tercinta Iklil Mutawakkil Daeng Riolo, semoga engkau menjadi pembaharu bagi keluarga kita.

Terima kasih kepada Ibu Tabita Mintu, SKM, M.Kes dan seluruh personel PTL BTKLPP Kelas I Makassar. Terima kasih kepada Andi Ilham dan Muhammad Nur Ichsan dari K3 RS. Wahidin Sudirohusodo. Terima kasih kepada Handayani, Kak Sapri dan seluruh personel Laboratorium Mikrobiologi Lt. 6 Rumah Sakit Universitas Hasanuddin. Terima kasih kepada Faiqah dan Andi Tenri dan seluruh personel Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar. Terima kasih kepada angkatan 2011 Biomedik Mikrobiologi Norma Kambuno, Adek cantik Tatia, Anita, Syam Kumaji, Sartika, Syahrani, Salsa, Nawir, Phia, Aslim, Fardi, dan Alhawaris. Terima kasih kepada mahasiswa magang Nis, Jannah dan Kiki dari Poltekkes Makassar.

Terima kasih kepada keluarga Adhyaksa Kak Erna, Nuhad, Rahma, Cemma, Hadijah, Dewi, Eka dan Cia. Terima kasih atas dukungan pada jam-jam kejujuran bersama Marini, Niyar Radde, Aliah Mansyur, dan Chandra Budiarti. Terakhir kepada adinda tercinta Andi Nurhasanah, cST atas aplikasi ilmu arsiteknya. Terkhusus kepada seseorang yang jauh disana, tesis ini awal perjalanan masa depan. Kepada seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, terima kasih atas dukungan dan doanya hingga rampungnya tesis ini.

Mohon maaf jika masih banyak kekurangan didalamnya, tiada karya manusia yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya.

Makassar, 30 Juli 2013

Arniati Samaila

## ABSTRAK

ARNIATI SAMAILA. *Identifikasi Bakteri di Udara Ruang Perawatan Intensif Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dengan Universal Primer dan Sekuensing* (dibimbing oleh Nasrum Massi dan Rizalinda Sjahril).

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi bakteri di ruang perawatan intensif (ICU, CVCU, PICU, dan NICU) Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo.

Metode yang digunakan dalam penelitian yaitu kultur, PCR, dan sekuensing. Identifikasi bakteri melalui kultur menggunakan media selektif dan pengujian biokimia. PCR universal primer 16S rRNA digunakan untuk mengamplifikasi DNA bakteri dan produknya yang berukuran 150 bp disekuensing dan dianalisis dengan program BLAST.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa melalui hasil kultur didapatkan 6 genus bakteri yaitu *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, dan *Escherichia*. Hasil sekuensing berupa sekuen 146 basa. Analisis menggunakan program BLAST pada database GenBank didapatkan 21 genus yaitu *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Achromatium*, *Alcaligenes*, *Georgfuchsia*, *Denitratisoma*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Alpha*, *Afipia*, *Leuconostoc*, *Rhodopseudomonas*, *Alkanindiges*, *Mesorhizobium*, *Brevundimonas*, *Pseudaminobacter*, *Sporosarcina*, *Clostridium*, *Bradyrhizobium*, dan *Caulobacter*. Perbandingan hasil identifikasi kultur dan sekuensing adalah 36 %. Kesimpulan penelitian ini adalah identifikasi kultur didapatkan 6 genus dan sekuensing didapatkan 21 genus.

## ABSTRACT

ARNIATI SAMAILA. *Identification of Bacteria in the Air Space Hospital Intensive Care Wahidin Sudirohusodo with Universal Primary and Sequencing* (guided by Nasrum Massi and Rizalinda Sjahril).

This study aims to identify the bacteria in intensive care (ICU, CVCU, PICU and NICU) Sudirohusodo Wahidin Hospital.

The method used in the study of culture, PCR, and sequencing. Identification of bacteria through culturing using selective media and biochemical testing. Universal 16S rRNA PCR primers used to amplify DNA of bacteria and their products are sized 150 bp were sequenced and analyzed by BLAST program.

The results showed that the culture results obtained over 6 genera of bacteria are Staphylococcus, Bacillus, Acinetobacter, Alcaligenes, Enterobacter, and Escherichia. Sequencing results of a sequence of 146 bases. Analysis using the BLAST program in the GenBank database found that 21 genera Staphylococcus, Burkholderia, Achromatium, Alcaligenes, Georgfuchsia, Denitratisoma, Acinetobacter, Bacillus, Paenibacillus, Alpha, Afipia, Leuconostoc, Rhodopseudomonas, Alkanindiges, Mesorhizobium, Brevundimonas, Pseudaminobacter, Sporosarcina, Clostridium, Bradyrhizobium, and Caulobacter. Comparison of culture identification and sequencing results was 36%. The conclusion of this study is the identification of cultures obtained 6 genera and 21 genera sequenced obtained.



## DAFTAR ISI

|  | halaman |
|--|---------|
| PRAKATA  | iv      |
| ABSTRAK  | vii     |
| ABSTRACT   | viii    |
| DAFTAR ISI   | ix      |
| DAFTAR TABEL   | xii     |
| DAFTAR GAMBAR  | xiii    |
| DAFTAR LAMPIRAN  | xiv     |
| DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN                        | xvi     |
| I. PENDAHULUAN   | 1       |
| A. Latar Belakang  | 1       |
| B. Rumusan Masalah                                       | 4       |
| C. Tujuan Penelitian                                     | 4       |
| D. Manfaat Penelitian                                    | 5       |
| II. TINJAUAN PUSTAKA                                     | 6       |
| A. Infeksi Nosokomial                                    | 6       |
| 1. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Infeksi<br>Nosokomial | 7       |
| 2. Epidemiologi Infeksi Nosokomial                       | 9       |
| B. Pemantauan Udara Ruang Rumah Sakit                    | 12      |

|                                     | <b>halaman</b> |
|-------------------------------------|----------------|
| C. Metode Sampling                  | 15             |
| D. Ruang Perawatan Intensif         | 22             |
| E. Polymerase Chain Reaction        | 25             |
| 1. Siklus PCR                       | 25             |
| 2. Komponen PCR                     | 26             |
| F. Elektroforesis                   | 27             |
| G. Universal Primer                 | 28             |
| H. Sekuensing                       | 34             |
| 1. Dasar-dasar Sekuensing           | 34             |
| 2. Permasalahan Sekuensing          | 35             |
| I. BLAST                            | 37             |
| J. Perbandingan fenotip dan genotip | 39             |
| K. Kerangka Konsep                  | 40             |
| III. METODE PENELITIAN              | 44             |
| A. Desain Penelitian                | 44             |
| B. Waktu dan Lokasi Penelitian      | 44             |
| C. Sampel                           | 44             |
| D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi    | 44             |
| E. Izin Penelitian                  | 45             |
| F. Teknik Pengambilan Sampel        | 45             |
| G. Defenisi Operasional             | 45             |

|                              | <b>halaman</b> |
|------------------------------|----------------|
| H. Alat dan Bahan Penelitian | 46             |
| 1. Alat Penelitian           | 46             |
| 2. Bahan Penelitian          | 46             |
| 3. Prosedur Kerja            | 46             |
| a. Pengambilan Sampel        | 46             |
| b. Kultur                    | 47             |
| c. Pengujian Molekular       | 47             |
| 1. Ekstraksi DNA             | 47             |
| 2. Pembuatan Gel Agarose     | 47             |
| 3. Amplifikasi PCR           | 48             |
| 4. Sekuensing                | 48             |
| I. Alur Penelitian           | 49             |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN     | 50             |
| A. Hasil                     | 50             |
| B. Pembahasan                | 55             |
| V. PENUTUP                   | 63             |
| A. Kesimpulan                | 63             |
| B. Saran                     | 63             |
| DAFTAR PUSTAKA               | 65             |
| LAMPIRAN                     | 71             |

## DAFTAR TABEL

| <b>nomor</b>  | <b>halaman</b> |
|---|----------------|
| 1. Persyaratan kesehatan lingkungan rumah sakit         | 13             |
| 2. Angka kuman udara ruang perawatan intensif           | 51             |
| 3. Data spesies hasil identifikasi kultur               | 52             |
| 4. Data spesies hasil BLAST                             | 53             |
| 5. Data perbandingan identifikasi kultur dan sekuensing | 54             |

## DAFTAR GAMBAR

| <b>nomor</b>   | <b>halaman</b> |
|--|----------------|
| 1. Sketsa ruangan kosong dan titik sampling  | 16             |
| 2. Sketsa ruang perawatan dan titik sampling   | 17             |
| 3. Bangsal TB dengan dua tempat tidur  | 19             |
| 4. 16S rRNA <i>Escherichia coli</i>  | 29             |
| 5. Kekerbatan bakteri hasil rekonstruksi gen 16S rRNA<br>dari data genom 1663 strain | 31             |
| 6. Koloni bakteri pada media PCA   | 51             |
| 7. Hasil PCR dengan primer universal   | 53             |
| 8. Sekuen awal sampel IK4  | 59             |

## DAFTAR LAMPIRAN

| <b>nomor</b>  | <b>halaman</b> |
|---|----------------|
| 1. Lokasi sampling  | 72             |
| 2. Titik sampling dan sngka kuman ICU                               | 74             |
| 3. Titik sampling dan angka kuman CVCU                              | 75             |
| 4. Titik sampling dan angka kuman PICU                              | 76             |
| 5. Titik sampling dan angka kuman NICU                              | 77             |
| 6. Tabel konversi koloni MAS-100                                    | 78             |
| 7. Data angka kuman udara RS. Wahidin Sudirohusodo<br>April 2013    | 79             |
| 8. Data angka kuman udara RS. Wahidin Sudirohusodo<br>Maret 2012    | 84             |
| 9. Data angka kuman udara RS. Wahidin Sudirohusodo<br>November 2012 | 87             |
| 10. Data hasil kultur sampel ICU                                    | 93             |
| 11. Data hasil kultur sampel CVCU                                   | 94             |
| 12. Data hasil kultur sampel PICU                                   | 96             |
| 13. Data hasil kultur sampel NICU                                   | 97             |
| 14. Data hasil BLAST sampel ICU                                     | 98             |
| 15. Data hasil BLAST sampel CVCU                                    | 99             |

| <b>nomor</b>                     | <b>Halaman</b> |
|----------------------------------|----------------|
| 16. Data hasil BLAST sampel PICU | 100            |
| 17. Data hasil BLAST sampel NICU | 101            |
| 18. Hasil sekuensing sampel ICU  | 102            |
| 19. Hasil sekuensing sampel CVCU | 105            |
| 20. Hasil sekuensing sampel PICU | 108            |
| 21. Hasil sekuensing sampel NICU | 111            |

## DAFTAR ARTI SINGKATAN

---

| Lambang/singkatan | Arti dan keterangan                           |
|-------------------|---|
| 16S rRNA          | 16 Subunit ribosomal Ribonucleic Acid         |
| A                 | Adenin  |
| Bacit             | Bacitracin                                    |
| BAP               | Blood Agar Plate                              |
| BLAST             | Basic Local Alignment Search Tool             |
| CFD               | Computational Fluid Dynamics                  |
| CFU               | Colony Forming Unit                           |
| CIT               | Citrate                                       |
| Convex            | Cembung                                       |
| CVCU              | Cardio Vascular Care Unit                     |
| DNA               | Deoxyribonucleic Acid, asam deoksiribonukleat |
| dNTP              | Deoksiribonukleotida Trifosfat                |
| EDTA              | Etilen Diamin Tetra Acetat                    |
| EMBA              | Eosin Methilen Blue Agar                      |
| Entire            | Rata  |
| Flat              | Rata, datar                                   |
| G                 | Guanin  |
| GLU               | Glukosa                                       |
| ICU               | Intensive Care Unit                           |
| KIA               | Kligler Iron Agar                             |

---



| <b>Lambang/singkatan</b> | <b>Arti dan keterangan</b> |
|--------------------------|----------------------------|
| Koa                      | Koagulase                  |
| LAK                      | Laktosa                    |
| LIA                      | Lysine Iron Agar           |
| MAL                      | Maltosa                    |
| MALO                     | Malosa                     |
| MAN                      | Manosa                     |
| MAS-100                  | Microbial Air System - 100 |
| MC                       | MacConkey                  |
| MIO                      | Motility Indol Ornithin    |
| MR-VP                    | Metil Red Vogel Paskuer    |
| MSA                      | Manitol Salt Agar          |
| N                        | Basa yang tidak jelas      |
| NA                       | Nutrien Agar               |
| NICU                     | Neonatal Care Unit         |
| NV                       | Novobiocin                 |
| OF                       | Oksidasi Fermentasi        |
| PAD                      | Phenil Alanin Deamenase    |
| PB                       | Polymixin B                |
| PBS                      | Phosphat Buffer Standar    |
| PCA                      | Plate Count Agar           |
| PCR                      | Polymerase Chain Reaction  |

| <b>Lambang/singkatan</b> | <b>Arti dan keterangan</b>               |
|--------------------------|--|
| PICU                     | Pediatric Care Unit                      |
| Raised                   | Pertumbuhan dengan cabang-cabang teratur |
| RH                       | Kelembaban relatif                       |
| RNA                      | Ribonucleic Acid                         |
| S                        | Sitosin                                  |
| SCA                      | Simmon's Citrate Agar                    |
| SUK                      | Sukrosa                                  |
| T                        | Timin                                    |
| TBE                      | Tris Borate                              |
| TSIA                     | Triple Sugar Iron Agar                   |
| Umbonate                 | Pertumbuhan tebal dengan tonjolan tumpul |
| Undulate                 | Bergelombang                             |
| URE                      | Urease                                   |
| WHO                      | World Health Organization                |

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang diperoleh selama masa perawatan kesehatan menjadi salah satu penyebab utama kematian dan morbiditas pada pasien rawat inap di seluruh dunia. Survei yang dilakukan dibawah naungan WHO di 55 rumah sakit dari 14 negara yang mewakili Eropa, Timur Tengah, Asia Tenggara dan Pasifik Barat menunjukkan rata-rata 8,7 % dari pasien rumah sakit memiliki infeksi nosokomial. Lebih dari 1,4 juta orang di seluruh dunia menderita komplikasi infeksi yang diperoleh di rumah sakit. Frekuensi infeksi nosokomial tertinggi dilaporkan dari rumah sakit di Timur Tengah dan Asia Tenggara, masing-masing 11,8 dan 10 %. Prevalensi 7,7 dan 9 % masing-masing di Eropa dan Pasifik Barat (WHO, 2002).

Infeksi nosokomial terjadi dalam waktu 48 jam setelah masuk rumah sakit, mempengaruhi 1 dari 10 pasien yang dirawat di rumah sakit. Menurut European Prevalence of Infection in Intensive Care Study (EPIC) yang melibatkan lebih dari 4500 pasien menunjukkan bahwa prevalensi infeksi nosokomial di ICU adalah 20,6 %. Pasien ICU sangat beresiko infeksi nosokomial karena penggunaan prosedur invasif dan immunocompromised. Infeksi nosokomial yang paling sering adalah

infeksi luka bedah, infeksi saluran kemih dan infeksi saluran pernapasan. Angka infeksi yang lebih tinggi diantara pasien karena usia tua atau kemoterapi. (Inweregbu, 2005; WHO, 2002)

Penyakit ditularkan melalui udara (jarak jauh), melalui kontak langsung atau tidak langsung atau kombinasi dari kedua rute. Patogen di udara tersebar melalui partikel atau droplet yang berasal dari kulit, saluran pernapasan bagian atas atau bawah, mulut hidung dan keadaan lain seperti muntah, tetesan air kran dan diare. Droplet pernapasan dapat membawa mikroorganisme seperti bakteri dan virus. Dalam studi klasik perpindahan udara, mengungkapkan hubungan antara ukuran droplet, penguapan dan tingkat jatuhnya. Ukuran tetesan dan rute perpindahan di udara, droplet kecil mulai menguap setelah dikeluarkan dan dengan demikian mengubah ukurannya sehingga droplet yang cukup kecil tetap tersuspensi di udara untuk waktu yang lama dan masih menular. Besar tetesan (>100  $\mu\text{m}$ ) dapat menetap di tanah sebelum mereka menjadi inti droplet. (Femstrom, 2013)

Dalam penelitian di Odense Universitets Hospital tentang sumber dan rute infeksi bahwa infeksi berasal dari flora endogen pasien dengan pasien lain dan melalui petugas serta peralatan rumah sakit. Mikroba berpindah secara langsung dan tidak langsung melalui udara, air, makanan dan obat-obatan. (Kolmos, 2007)

Penelitian jenis bakteri kontaminan udara pada ruang perawatan sub bagian penyakit dalam Rumah Sakit Daerah Banjarbaru dengan metode kultur mengidentifikasi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus B hemolyticus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. (Budiarti dkk, 2007; Hadinegoro dkk, 2004)

Monitoring kualitas udara di ruang perawatan Taichung Veteran General Hospital memperoleh angka kuman 55 hingga 600 cfu. Metode Real Time PCR mendeteksi bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial yakni *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan methicilli-sensitive *S. aureus*. (Wu MJ, 2011)

Pada penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo bekerjasama dengan Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BTKLPP) Kelas I Makassar pada bulan Maret dan November 2012 diperoleh angka kuman udara untuk ICU rata-rata 917 cfu/m<sup>3</sup> dan 839cfu/m<sup>3</sup>, (PICU) 1.270 cfu/m<sup>3</sup> dan >1885 cfu/m<sup>3</sup>, NICU rata-rata > 1623 cfu cfu/m<sup>3</sup>, dan CVCU rata-rata 928 cfu/m<sup>3</sup> dan 836 cfu/m<sup>3</sup>. (Data tidak dipublikasikan)

Gen 16S rRNA disekuensing untuk hampir semua bakteri patogen yang ditemukan dalam cairan tubuh, sangat mungkin untuk merancang primer PCR yang mampu mengamplifikasi semua Eubacteria berdasarkan sifat konservatif dari gen 16S rRNA. Telah dirancang satu set primer tersebut dan menemukan bahwa universal PCR ini dapat mengamplifikasi

semua bakteri yang telah dikaji sampai saat ini. (Lu Jang-Jih et. al, 2000; Soergel dkk, 2012; Baker dkk, 2003)

Dalam 15 tahun terakhir, telah ada ribuan publikasi menggunakan sekuensing gen 16S rRNA sebagai deskripsi spesies. Identifikasi bakteri secara tradisional berdasarkan karakteristik fenotip umumnya tidak seakurat identifikasi berdasarkan metode genotip. Mengidentifikasi strain yang sulit dengan metode fenotipik dengan profil biokimia yang membingungkan, maka sekuensing gen 16S rRNA adalah pilihan yang sangat baik dan banyak digunakan. GenBank, bank data terbesar nukleotida memiliki lebih dari 20 juta deposit sekuensing dan 90.000 diantaranya adalah gen 16S rRNA. Ini berarti bahwa banyak deposit sekuensing sebagai pembandingan terhadap strain yang tidak diketahui. (Clarridge, 2004; Woo dkk, 2003; Kiratisin, 2003; Wang, 2009)

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalahnya yaitu bagaimana mengidentifikasi bakteri di udara ruang perawatan intensif dengan primer universal dan sekuensing.

## **C. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan umum**

Mengidentifikasi bakteri di udara ruang perawatan intensif Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dengan primer universal dan sekuensing.

## 2. Tujuan khusus

Mengidentifikasi bakteri di udara ruang perawatan intensif dengan metode kultur dan sekuensing.

### **D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi keragaman spesies bakteri di udara ruang perawatan intensif sehingga dapat menjadi pertimbangan untuk meningkatkan kebersihan ruangan.
2. Memberikan gambaran pentingnya kontrol udara ruang perawatan intensif agar mengurangi morbiditas pasien.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Infeksi Nosokomial**

Infeksi nosokomial dikenal sebagai infeksi yang diperoleh selama perawatan di rumah sakit. Meskipun kesehatan masyarakat dan perawatan rumah sakit mengalami kemajuan, infeksi terus berkembang pada pasien rawat inap dan juga dapat mempengaruhi petugas rumah sakit. Banyak faktor yang menyebabkan infeksi pada pasien di rumah sakit misalnya imunitas yang menurun antara pasien, berbagai prosedur medis dan teknik invasif menciptakan rute infeksi potensial dan transmisi bakteri yang resisten terhadap obat antara populasi di rumah sakit yang penuh sesak dimana rendahnya kontrol infeksi semakin memudahkan penularan. (WHO, 2002)

Dampak infeksi nosokomial, menambah kecacatan fungsional dan mungkin stres pasien serta mengurangi kualitas hidup. Infeksi nosokomial juga salah satu penyebab utama kematian, biaya ekonomi yang cukup besar terhadap peningkatan rawat inap pasien yang terinfeksi adalah peningkatan biaya. Satu studi menunjukkan bahwa peningkatan keseluruhan dalam durasi rawat inap untuk pasien dengan infeksi luka bedah adalah 8,2 hari, mulai dari 3 hari untuk ginekologi menjadi 9,9 hari untuk operasi umum dan 19,8 untuk operasi ortopedi. Tinggal



berkepanjangan tidak hanya meningkatkan biaya langsung karena kehilangan pekerjaan. Peningkatan penggunaan obat-obatan, kebutuhan untuk isolasi dan penggunaan laboratorium tambahan dan studi diagnostik lainnya juga berkontribusi terhadap biaya. (Foglia et. al, 2007. WHO, 2002)

### **1. Faktor-faktor yang mempengaruhi infeksi nosokomial**

Pasien terkena berbagai mikroorganisme selama rawat inap. Kontak antara pasien dan mikroorganisme tidak dengan sendirinya, banyak jenis bakteri, virus, jamur dan parasit menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi mungkin disebabkan oleh mikroorganisme yang diperoleh dari orang lain dirumah sakit (infeksi silang) atau mungkin disebabkan oleh flora pasien sendiri (infeksi endogen). (Mims et. al, 2004)

Beberapa organisme dapat diperoleh dari patogen yang berasal dari luar (penyakit bawaan makanan, udara, gas gangren, tetanus dll) atau disebabkan oleh mikroorganisme dari lingkungan (misalnya difteri, TBC). Kebanyakan infeksi di rumah sakit saat ini disebabkan oleh mikroorganisme yang umum pada penduduk dimana menyebabkan penyakit ringan (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus koagulase negatif*, *Enterococci*, *Enterobacteriaceae*). (WHO, 2002)

#### **a. Susceptibilitas pasien**

Faktor yang mempengaruhi infeksi termasuk usia, status imunitas, penyakit dan intervensi diagnostik dan terapi. Pasien dengan penyakit kronis seperti tumor ganas, leukimia, diabetes mellitus, gagal ginjal atau

acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) memiliki patogen oportunistik. Infeksi dengan organisme yang biasanya tidak berbahaya misalnya flora bakteri normal manusia dapat menjadi patogen ketika imunologi tubuh terganggu. Obat immunosupresif atau iradiasi dapat menurunkan resistensi terhadap infeksi. Cedera pada kulit atau selaput lendir melewati mekanisme pertahanan alami. Malnutrisi juga beresiko. Banyaknya diagnostik modern dan prosedur terapi seperti biopsi, pemeriksaan endoskopi, kateterisasi, intubasi / ventilasi dan prosedur bedah meningkatkan resiko infeksi. Jadi jaringan atau biasanya bagian steril seperti saluran kemih dan saluran pernapasan bagian bawah terkontaminasi benda atau zat secara langsung. (Foglia et. al, 2007)

#### b. Lingkungan

Rumah sakit merupakan sumber potensial infeksi untuk pasien dan petugas. Pasien yang terinfeksi dalam rumah sakit merupakan sumber lebih lanjut dari infeksi. Ramainya kondisi rumah sakit, seringnya transfer pasien dari satu unit ke unit lain dan pasien yang rentan (bayi baru lahir, pasien luka bakar, perawatan intensif), semua berkontribusi terhadap perkembangan infeksi nosokomial. Mikroba dapat mengkontaminasi benda, perangkat dan bahan yang kemudian berhubungan dengan bagian tubuh yang rentan. (Kolmos, 2007)

### c. Resistensi bakteri

Banyak pasien menerima obat antimikroba melalui seleksi dan pertukaran elemen resistensi genetik, antibiotik menyebabkan munculnya strain bakteri multidrug-resisten. Mikroorganisme dalam flora manusia biasanya sensitif terhadap obat supresi sedangkan strain resisten bertahan dan mungkin menjadi endemik di rumah sakit. Penggunaan luas antimikroba untuk terapi atau profilaksis topikal merupakan penentu utama resistensi. Agen antimikroba yang dalam beberapa kasus, menjadi kurang efektif karena resisten. Bakteri resisten terhadap obat ini akhirnya muncul dan dapat menyebar perawatan kesehatan. Banyak strain Pneumococci, Staphylococci, Enterococci dan TB saat ini tahan terhadap sebagian besar atau semua antimikroba yang dulunya efektif. Multiresisten Klebsiella dan Pseudomonas aeruginosa lazim di banyak rumah sakit. Masalah ini sangat penting dalam mengingat lebih mahalnya lini kedua antibiotik, mungkin tidak tersedia atau terjangkau. (Mitani, 2005; Peleg et. al, 2010)

## **2. Epidemiologi infeksi nosokomial**

Studi seluruh dokumen dunia bahwa infeksi nosokomial adalah penyebab utama morbiditas dan mortalitas. Frekuensi yang tinggi dari infeksi nosokomial adalah bukti dan kualitas buruk layanan kesehatan dan membengkaknya biaya. Banyak faktor yang berkontribusi terhadap frekuensi infeksi nosokomial : pasien rawat inap yang

immunocompromised, mereka menjalani pemeriksaan invasif, praktek perawatan pasien dan lingkungan rumah sakit penyebab transmisi mikroorganisme antara pasien. Penggunaan antibiotik intens memicu resistensi antibiotik. Sementara kemajuan dalam pencegahan infeksi nosokomial telah dibuat, perubahan praktek medis menjadi kesempatan baru untuk berkembangnya infeksi. (Mims et. al, 2004)

#### 1. Infeksi saluran kemih

Infeksi nosokomial yang paling umum, 80 % infeksi yang terkait dengan penggunaan kateter pada kandung kemih kateter. Infeksi saluran kemih berhubungan dengan morbiditas, kadang-kadang dapat menyebabkan bakteremia dan kematian. Infeksi biasanya didasarkan pada kultur kuantitatif urin ( $\geq 10^5$  mikroorganisme / mL, dengan maksimal dari 2 spesies mikroba yang terisolasi). Bakteri yang timbul dari flora usus, baik normal (*Escherichia coli*) atau diperoleh di rumah sakit (*Klebsiella multiresisten*). (Frogliia et. al, 2007; Mims et. al, 2004)

#### 2. Infeksi pasca bedah

Angka kejadian bervariasi dari 0,5 sampai 15 % tergantung pada jenis operasi dan status pasien. Infeksi luka bedah dan infeksi dalam organ atau ruang organ diidentifikasi secara terpisah. Infeksi biasanya diperoleh selama operasi baik secara eksogen (misalnya dari peralatan, udara, ahli bedah dan petugas lainnya), endogen dari flora di kulit atau di daerah operasi atau bisa dari darah yang digunakan dalam operasi.

Mikroorganisme menginfeksi tergantung pada jenis dan lokasi operasi dan antimikroba yang diterima pasien. Faktor resiko utama adalah sejauh mana kontaminasi selama prosedur (bersih, terkontaminasi, kotor), yaitu sebagian besar tergantung pada lamanya operasi dan kondisi umum pasien. Faktor-faktor lain termasuk kualitas tehnik bedah, kehadiran benda asing, termasuk saluran air, virulensi dari mikroorganisme, seiring infeksi di bagian lain, penggunaan cukur pra operasi dan pengalaman dari tim bedah. (Foglia et. al, 2007; Mims et. al, 2004)

### 3. Pneumonia

Nosokomial pneumonia terjadi di berbagai kelompok pasien yang paling penting adalah pasien ventilator di unit perawatan intensif, dimana persentase pneumonia adalah 3 % per hari. Mikroorganisme berkoloni di perut, bagian atas pernapasan dan bronkus, dan menyebabkan infeksi di paru-paru (pneumonia), secara endogen (sistem pencernaan atau hidung dan tenggorokan), tetapi mungkin eksogen, sering dari peralatan yang tercemar pernapasan. Definisi pneumonia mungkin didasarkan pada klinis. Kondisi pasien (kegagalan organ) dan penggunaan antibiotik sebelumnya, selain ventilator yang berasosiasi dengan pneumonia, pasien dengan kejang atau penurunan tingkat kesadaran beresiko untuk infeksi nosokomial. Di negara-negara dengan prevalensi tinggi tuberkulosis, terutama strain multiresisten, transmisi selama perawatan kesehatan mungkin merupakan masalah penting. (WHO, 2002)

#### 4. Bakteremia

Infeksi ini merupakan sebagian kecil dari infeksi nosokomial (sekitar 5 %), kejadian ini meningkat terutama untuk organisme tertentu seperti multiresisten koagulase-negatif *Staphylococcus* dan *Candida spp.* Infeksi dapat terjadi pada perangkat kulit intravaskular, atau di subkutan kateter, organisme berkoloni di kateter menyebabkan bakteremia tanpa infeksi eksternal yang terlihat. Flora kulit merupakan sumber dari infeksi, faktor resiko utama adalah panjangnya kateterisasi, tingkat asepsis pada penyisipan dan perawatan lanjutan kateter. (Menezes, 2009)

#### 5. Infeksi nosokomial lainnya

Empat yang paling sering dan penting infeksi nosokomial, tetapi ada banyak lainnya. Kulit dan jaringan lunak : luka terbuka (borok, luka bakar dan luka baring) mendorong kolonisasi bakteri dan dapat menyebabkan infeksi sistemik. Gastroenteritis adalah infeksi nosokomial yang paling umum pada anak-anak, dimana rotavirus adalah patogen utamanya. *Clostridium difficile* merupakan penyebab utama nosokomial gastroenteritis pada orang dewasa di negara maju. Sinusitis dan infeksi enterik lainnya, infeksi mata dan konjungtiva. Endometritis dan infeksi lain dari organ reproduksi setelah melahirkan. (Inweregbu, 2005)

### **B. Pemantauan Udara Ruang Rumah Sakit**

Rumah sakit sebagai sarana pelayanan kesehatan, tempat berkumpulnya orang sakit maupun orang sehat, atau dapat menjadi

tempat penularan penyakit serta memungkinkan terjadinya pencemaran lingkungan dan gangguan kesehatan, maka perlu penyelenggaraan kesehatan lingkungan rumah sakit sesuai persyaratan kesehatan berdasarkan keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1204/MENKES/SK/X/2004 tentang persyaratan kesehatan lingkungan rumah sakit (Tabel 1). (Depkes, 2004)

Tabel 1; Persyaratan kesehatan lingkungan rumah sakit

| No | Ruang atau Unit         | Konsentrasi Maksimum Mikroorganisme per m <sup>3</sup> Udara (CFU/m <sup>3</sup> ) |
|----|-------------------------|--|
| 1  | Operasi                 | 10   |
| 2  | Bersalin                | 200  |
| 3  | Pemulihan               | 200-500  |
| 4  | Observasi bayi          | 200  |
| 5  | Perawatan bayi          | 200  |
| 6  | Perawatan premature     | 200  |
| 7  | ICU                     | 200  |
| 8  | Jenazah / autopsi       | 200-500  |
| 9  | Penginderaan medis      | 200  |
| 10 | Laboratorium            | 200-500  |
| 11 | Radiologi               | 200-500  |
| 12 | Sterilisasi             | 200  |
| 13 | Dapur                   | 200-500  |
| 14 | Gawat Darurat           | 200  |
| 15 | Administrasi, pertemuan | 200-500  |
| 16 | Ruang Luka Bakar        | 200  |

Kontrol ventilasi sebagai salah satu cara mencegah penyebaran mikroba melalui udara. Tidak ada perbedaan pendapat lagi bahwa infeksi *Legionella* menyebar melalui AC. Perlu pengelolaan sistem sirkulasi udara untuk meminimalkan kontaminasi melalui udara kepada petugas dalam ruangan tersebut. Transmisi melalui udara juga dapat dilakukan dengan mengisolasi pasien infeksius dalam ruangan khusus, pasien dengan MRSA, *C. Difficile*, VRE dan infeksi gram negatif. Petugas dilengkapi dengan masker, pakaian dan sarung tangan yang dapat melindunginya. (Li Y et. al, 2007; Wu MJ et. al, 2011)

Pakaian pelindung penting untuk petugas saat terkena cairan tubuh misalnya keringat, cairan orofaringeal, darah atau urin. Sarung tangan dan celemek harus dipakai untuk menangani cairan tubuh. Masker high efficiency particulate air (HEPA) direkomendasikan untuk pasien BTA positif dengan TB. Tangan harus tetap dicuci setelah melepaskan sarung tangan karena masih mungkin terjadi kontaminasi. Penggunaan prosedur invasif meningkatkan resiko infeksi nosokomial. Untuk akses vena, resiko ini dapat dikurangi dengan penggunaan vena subklavia daripada vena femoralis. Tunneling kateter mengurangi resiko infeksi nosokomial, antimikroba diresapkan pada kateter dapat mengurangi infeksi kateter. Teknik ini sangat penting dalam penyisipan kateter intravaskular. Sterilisasi ruangan dapat dilakukan untuk mengurangi mikroba dengan menggunakan desinfektan. Penyebaran infeksi dapat dikurangi karena



kesadaran pelaksanaan tindakan pencegahan dan pengendalian infeksi yang tepat. (Inweregbu, 2005; Mims, 2004)

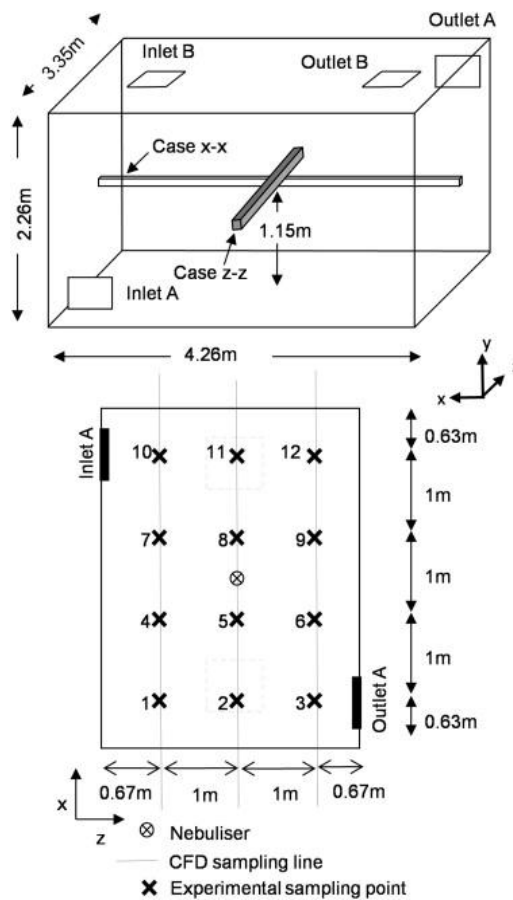
### **C. Metode Sampling**

Aerosol dapat didefinisikan sebagai suatu suspensi mikroskopis padat atau cair partikel di udara untuk suatu periode waktu. Bioaerosol termasuk bakteri, ragi, jamur, spora bakteri dan virus. Perilaku dinamis dari aerosol dipengaruhi oleh beberapa faktor: fisik (gerak Brown, gradien elektromagnetik, medan radiasi listrik, gravitasi, kerapatan partikel, gradien termal, kelembaban, ventilasi) dan biologi (misalnya, keberadaan nutrisi dan senyawa antimikroba). (Pasquarella, 2000; Kochevar, 2006)

Dalam prakteknya, kondisi optimal tidak pernah ada karena : (Pasquarella, 2000)

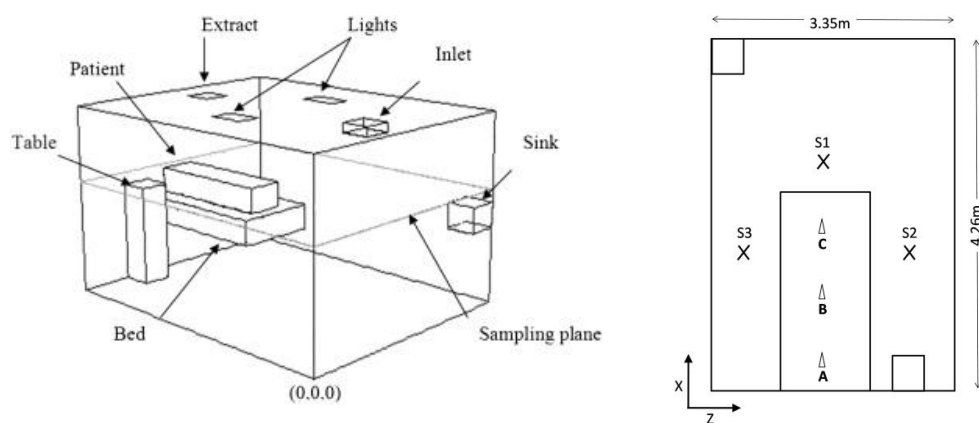
- (1) distribusi spasial partikel yang tidak seragam, semakin dekat sumber kontaminasi (terutama staf operasi), semakin tinggi jumlah cfu/m<sup>3</sup>;
- (2) partikel sangat bervariasi dalam bentuk, dimensi dan kepadatan;
- (3) staf operasi menyebabkan turbulensi udara;
- (4) untuk nilai-nilai rendah cfu/m<sup>3</sup>, sampling menunjukkan distribusi statistik yang luas, meningkatkan ketidaksesuaian antara data yang diperoleh dengan metode aktif dan pasif karena perbedaan dalam waktu sampling dan lokasi spasial.

Aerobiologi berperan penting dalam penularan penyakit menular. Praktisi terus menggunakan teknik kontemporer (misalnya komputasi dinamika fluida untuk mempelajari aliran partikel, metode PCR untuk mengukur variasi konsentrasi partikel dan epidemiologi untuk melacak penyebaran penyakit), variabel utama yang mempengaruhi transmisi udara patogen menjadi lebih dikenal. Variabel aerobiological (misalnya, ukuran partikel, jenis partikel, durasi partikel dapat tetap di udara, jarak partikel dalam melakukan perjalanan, meteorologi dan faktor lingkungan), serta asal-usul umum dari partikel menular. (Fernstrom, 2013)



Gambar 1. Sketsa ruangan kosong dan titik sampling (Hathway, 2011)

Komputasi Dinamika Fluida (CFD) semakin populer sebagai software untuk mempelajari dampak transmisi mikroorganisme menular. Penerapan pemodelan CFD untuk evaluasi risiko bioaerosol. Sebuah studi validasi eksperimental memberikan perbandingan langsung antara simulasi CFD dan distribusi bioaerosol, menunjukkan skala pasif dan pendekatan pelacakan bioaerosols. Studi ini bertujuan untuk mengetahui representasi waktu rata-rata pelepasan bakteri dari suatu kegiatan dalam suatu lokasi. Pendekatan ini terbukti dengan baik ketika divalidasi secara numerik ketika dibandingkan dengan pola dispersi waktu rata-rata. Namun, suatu titik yang representatif tergantung pada aliran udara. Penerapan model ditunjukkan dengan menggunakan simulasi ruang isolasi. (Hathway, 2011)



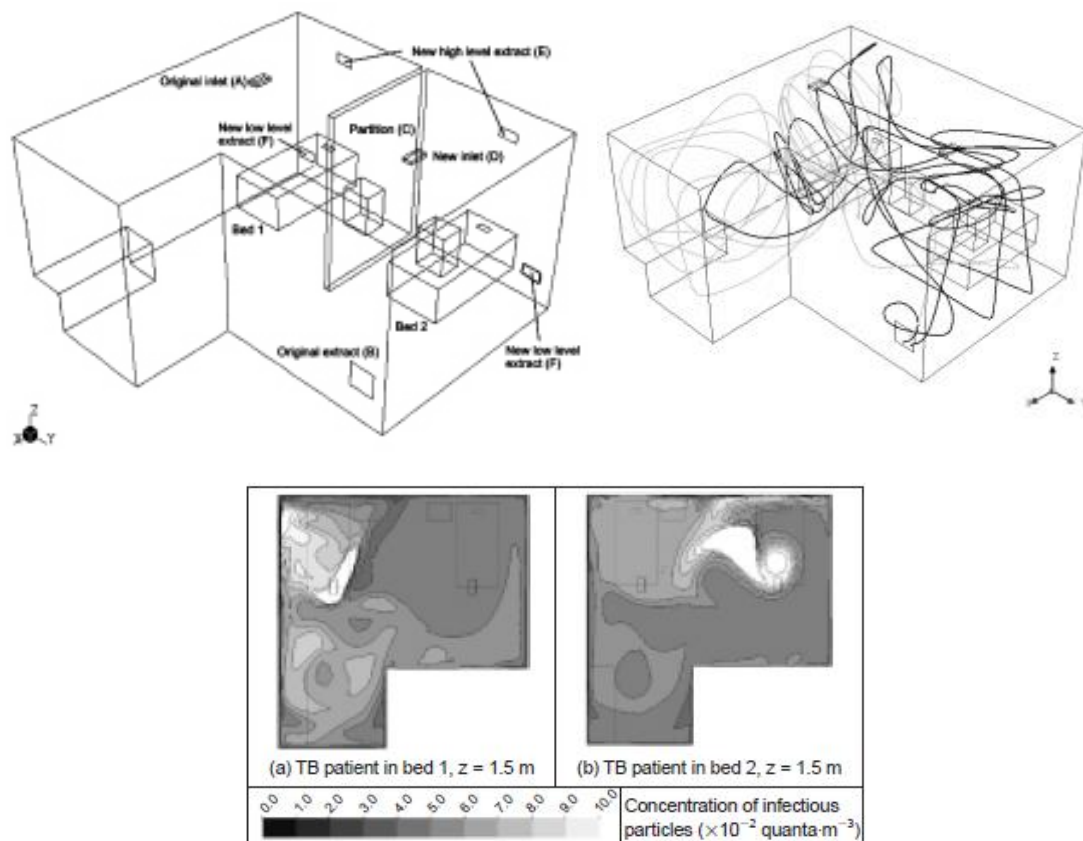
Gambar 2. Sketsa ruang perawatan dan titik sampling (Hathway, 2011)

Tujuan simulasi aliran untuk mengetahui bagaimana perilaku aliran dalam sistem untuk satu set, inlet maupun outlet. Konsep dasar metode CFD menemukan nilai-nilai dari jumlah aliran pada sejumlah besar poin dalam sistem. Dalam desain dan aplikasi analisis, metode CFD dengan cepat menggantikan metode eksperimental dan analitis. Selain kecepatan dan mengurangi biaya, metode CFD jika dibandingkan dengan prosedur eksperimental dalam aplikasi teknik menawarkan satu set yang informasi lebih lengkap. Menyediakan semua arus informasi yang relevan di seluruh domain yang menarik. Metode eksperimental sebagian besar terbatas pada pengukuran beberapa jumlah arus pada lokasi tertentu oleh alat ukur. Simulasi CFD juga memungkinkan solusi aliran pada skala sebenarnya dari sistem rekayasa dengan kondisi operasi yang sebenarnya. (Sayma, 2009; Gilkeson et.al, 2011)

Komputasi dinamika Fluida (CFD) digunakan untuk mensimulasikan dan membandingkan pengurangan mikroba menggunakan sejumlah sistem ventilasi yang berbeda. Selain meningkatkan tingkat ventilasi udara, hasil CFD mengungkapkan bahwa kinerja ventilasi dan pengurangan mikroba dapat ditingkatkan. (Yam, 2011)

Komputasi dinamika Fluida (CFD) dapat memprediksi risiko distribusi spasial infeksi penyakit transmisi udara di bangsal rumah sakit. Metode baru ini diterapkan untuk menganalisis risiko penularan wabah di bangsal 8A SARS rumah sakit di Hong Kong pada tahun 2003. (Qian et.al, 2003)

Persamaan aliran fluida berdasar pada persamaan diferensial yang mewakili keterkaitan antara variabel aliran dan perubahannya dalam ruang dan waktu. Hukum gerak yang berlaku untuk padatan berlaku untuk semua hal, termasuk cairan dan gas. Sebuah perbedaan mendasar antara cairan dan padatan adalah bahwa cairan mendistorsi tanpa batas. Gaya inersia yang bekerja pada elemen fluida seimbang dengan permukaan dan kekuatan seperti gravitasi dan elektromagnetis. Dasar perhitungannya pada aliran udara, temperatur, volume ruang dan turbulensi. (Sayma, 2009)



Gambar 3. Bangsal TB dengan dua tempat tidur (Noakes et. al, 2006)

Suatu bangsal TB yang memiliki luas lantai 23 m<sup>2</sup> dan dirancang untuk menampung dua pasien. Geometri disederhanakan untuk hanya menyertakan item utama furniture dan semua pintu dan jendela diasumsikan ditutup dan karena itu tidak ditampilkan. Dalam setiap kasus, pasien diasumsikan melepaskan partikel menular ke udara pada tingkat yang konstan dan transportasi dari infeksi seluruh ruangan dimodelkan dengan mengasumsikan partikel adalah ukuran yang cukup kecil untuk dianggap sebagai konsentrasi skalar yang diatur oleh gerakan massal dari udara. (Noakes et. al, 2006)

Lokasi pengambilan sampel harus dipilih untuk membantu dalam evaluasi hipotesis. Jika mengevaluasi eksposur pekerja, maka sampling harus ditempatkan di daerah yang dihuni eksposur pekerja yang dapat diukur. Jika mengevaluasi kontaminasi sistem ventilasi, maka pengambilan sampel dalam sistem dan di louver ventilasi yang sesuai. (Jensen, 1998)

Metode mengkuantifikasi aliran mikroba secara langsung terkait dengan kontaminasi permukaan yang berasal dari mikroba. Indeks pencemaran udara mikroba didasarkan pada hitungan kejatuhan mikroba pada petri yang dibiarkan terbuka ke udara sesuai dengan skema 1/1/1 (untuk 1 jam, 1 m dari lantai, setidaknya 1 m dari dinding atau hambatan lainnya). Petri dibiarkan terbuka 1 jam dengan posisi 80-100 cm atau sekitar 1,2-1,5 m dari lantai dan 100-150 cm dari dinding. (Pasquarella, 2000; Sudharsanam, 2012; Yassin, 2010; Park, 2013)

Kami menyarankan pengambilan sampel optimal, volume sekitar 1 m<sup>3</sup> (1000L). Menggunakan volume ini tidak menghasilkan masalah substansial, hanya koloni yang diinkubasi terlalu padat untuk dihitung secara akurat. Menggunakan volume yang lebih rendah dapat menyebabkan kesulitan tafsir dan cenderung membuat lebih banyak data kualitatif. Sampling volume paling baik lebih besar dari 0.25 m<sup>3</sup> (250 L) dan optimal sekitar 1 m<sup>3</sup> (1000 L). (Hoffman, 2002)

Kontaminasi adalah proses non homogen; semakin dekat sumber, semakin tinggi resiko kontaminasi; dan kontaminasi adalah proses yang dinamis; semakin lama permukaan terkena, semakin tinggi resiko kontaminasi. Kebanyakan standar merekomendasikan cfu/m<sup>3</sup> untuk proses kontaminasi. (Pasquarella, 2000)

Louis Pasteur, orang pertama yang menggunakan medium nutrisi untuk mengumpulkan mikroorganisme. Beberapa tahun kemudian Robert Koch, pertama kali menggunakan plate terbuka untuk menghitung mikroba udara ruang. (Pasquarella, 2000)

Media umum digunakan untuk mendeteksi dan enumerasi jamur, bakteri, dan Actinomycetes termofilik. Media plate dapat digunakan untuk menumbuhkan atau media selektif. Tryptic soy agar (TSA), casein soy peptone agar (CSPA) and nutrient agar (NA) yang spektrum luas untuk enumerasi dan penghitungan bakteri. Media selektif sering digunakan untuk mikroorganisme spesifik. (Jensen, 1998)

Konsentrasi total mikroorganisme hasil kultur dihitung dengan membagi volume udara sampel ke dalam jumlah total koloni yang diamati pada media. Sebuah koloni adalah terlihat pertumbuhan makroskopik mikroorganisme pada media kultur padat. Konsentrasi bioaerosol kultur biasanya dilaporkan sebagai colony forming unit (CFU) per satuan volume udara. CFU adalah jumlah mikroorganisme yang dapat bereplikasi membentuk koloni. (Jensen, 1998)

Seringkali, sulit untuk mengidentifikasi beberapa koloni di satu lokasi pada media karena kurangnya morfologi diferensial koloni atau karena bahan kimia yang dikeluarkan oleh salah satu mikroorganisme yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain di lokasi yang sama. Selain itu, beberapa organisme berukuran besar, koloni menyebar sementara yang lain menghasilkan mikrokoloni. Morfologi koloni dari satu mikroorganisme dapat sepenuhnya mengaburkan yang lain. Beberapa spesies mungkin terlalu rewel untuk tumbuh dalam kultur laboratorium. Misalnya, beberapa bioaerosol misalnya, *Legionella pneumophila*, *Histoplasma capsulatum* atau *Pneumocystis carinii* sangat sulit, jika bukan tidak mungkin, untuk diisolasi dan dikultur. (Jensen, 1998)

#### **D. Ruang Perawatan Intensif**

ICU memiliki prevalensi tertinggi infeksi nosokomial di rumah sakit. European Prevalence of Infection in Intensive Care Study (EPIC) menunjukkan bahwa prevalensi infeksi nosokomial di ICU adalah 20,6 %.



Pasien ICU sangat beresiko infeksi nosokomial melalui penggunaan ventilasi mekanis, penggunaan prosedur invasif dan kondisi immunocompromised. (Inweregbu, 2005)

Sebagian besar pasien MICU terinfeksi MRSA, sebelumnya mereka tidak memiliki riwayat MRSA. Frekuensi tertinggi kontak antara petugas kesehatan dan pasien (peluang untuk cross-transmisi). Petugas kesehatan dapat terkontaminasi langsung oleh pasien, lingkungan, atau melalui infeksi endogen. Pasien kesehatan dapat terkontaminasi langsung oleh pasien, lingkungan atau melalui infeksi endogen. Pasien dapat memperoleh MRSA langsung dari lingkungan yakni tanpa tangan staf sebagai perantara. Dalam sebuah studi, umumnya permukaan lingkungan sekitar pasien sebagai sumber kontaminasi MRSA seperti kulit pasien. Secara keseluruhan, transmisi tidak langsung tampaknya memainkan peran utama karena menyumbang lima perenam lintas transmisi. (Hall, 2012)

Kejadian infeksi nosokomial yang disebabkan oleh meningkatnya organisme resisten antibiotik. Data tahun 2003 dari Pusat Pengendalian Penyakit dan Infeksi Nasional dalam ringkasan surveilans nosokomial menunjukkan bahwa unit perawatan intensif Amerika Serikat 28,5 % dari infeksi Enterococcal resisten terhadap vankomisin, 59,5 % dari infeksi *Staphylococcus aureus* resisten methicillin, 20,6 % dari infeksi *Klebsiella pneumoniae* resisten terhadap generasi ketiga cephalosporin dan 29,5 %

dari infeksi *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap quinolones. (Foglia et. al, 2007)

Studi di populasi dewasa menunjukkan faktor resiko beragam untuk infeksi bakteri multidrug-resisten, termasuk usia lanjut, penyakit yang mendasari, meningkat keparahan penyakit, transfer pasien interinstitutional, rumah sakit yang berkepanjangan, paparan perangkat invasif, paparan obat antimikroba, dan kontaminasi lingkungan. Beberapa penelitian pada orang dewasa menunjukkan bahwa munculnya infeksi resisten antibiotik pada pasien rawat inap memberikan kontribusi untuk tingkat kematian yang lebih tinggi dan 4,5 hari lebih lama. (Hall, 2012)

Beberapa penelitian telah dilakukan mempelajari faktor resiko untuk kolonisasi bakteri gram negatif resisten antibiotik pada pasien PICU. Bakteri gram positif yang paling umum penyebab infeksi nosokomial dengan *Staphylococcus aureus* menjadi patogen dominan. Telah ada peningkatan bakteri resisten antibiotik yang berasosiasi dengan infeksi nosokomial di ICU. Bakteri mengembangkan resistensi ketika memperoleh material genetik yang baru, materi genetik yang mengkode resistensi ditransfer ke strain lainnya. *Methicillin resistant S. aureus* (MRSA) menyebabkan hingga 60 % dari infeksi nosokomial di ICU. Antibiotik spektrum luas seperti vankomisin biasanya diresepkan untuk pengobatan namun dilaporkan telah resisten terhadap Enterococci dan *S. aureus*. Oleh karena itu, sekarang pelanggaran penggunaan vankomisin

sebagai pengobatan lini pertama untuk diare *Clostridium difficile*. (Inweregbu, 2005)

## E. Polymerase Chain Reaction

### 1. Siklus PCR

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang, meliputi denaturasi, annealing, dan ekstensi oleh enzim DNA polymerase. *Taq* DNA polymerase diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*) dikembangkan pada tahun 1988. Enzim ini tahan sampai suhu mendidih 100°C, dan aktifitas maksimalnya pada suhu 70-72°C. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hybrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. (Fatchiyah dkk., 2011)

Dasar siklus PCR yang utama merupakan siklus berulang 30-35 siklus, meliputi : (Fatchiyah dkk., 2011)

- Denaturasi (95°C), 30 detik. Pada langkah ini, heliks ganda DNA terurai menjadi dua untai cetakan DNA tunggal.
- Annealing (55-60°C), 30 detik. Pada langkah ini terjadi proses pengenalan/penempelan primer cetakan DNA, suhu annealing ditentukan oleh susunan primer. Optimalisasi suhu annealing dimulai dengan menghitung *melting temperature* ( $T_m$ ) dari ikatan primer dan

cetakan DNA, sedangkan suhu annealing ( $T_A$ ) adalah 5°C lebih kecil dari  $T_m$  primer yang sebenarnya.

- Ekstensi (72°C). Pada langkah ini terjadi proses polimerasi untuk pembentukan untai DNA baru. Waktu yang dibutuhkan tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang digandakan sebagai produk amplifikasi.

## 2. Komponen PCR

Pertama, cetakan DNA dengan ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (1000 bp) atau 1 kB. Hasil amplifikasi yang efisien adalah antara 100-400 bp.

Kedua, primer spesifik dari urutan nukleotida yang dapat diunduh dari pusat GenBank dan dapat disintesis berdasarkan susunan nukleotida yang sudah tersusun dan kita tentukan. Primer disusun dari urutan oligonukleotida sepanjang 15-32 bp pada ujung-5' pita DNA cetakan maupun komplemennya. Fungsi primer adalah menyediakan ujung-3'OH yang akan digunakan untuk menempelkan molekul DNA pertama dalam proses polimerisasi.

Ketiga, *Taq* DNA polimerase yang termostabil dan diisolasi dari *Thermus aquaticus*. Aktifitas polimerisasi DNA dari ujung-5' ke ujung-3' dan aktivitas enzimatis ini mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada suhu 95°C. Penggunaan enzim ini harus memperhatikan proses

penyimpanan (selalu di freezer pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ ) dan pada saat pengambilan tidak boleh terlalu lama di suhu ruang.

Keempat, buffer PCR dan ion  $\text{Mg}^{2+}$  merupakan faktor yang sangat kritikal karena kemungkinan dapat mempengaruhi proses annealing primer, suhu disosiasi untai cetakan DNA dan produk PCR.

Kelima, nukleotida (dNTP) biasanya dengan konsentrasi  $200\ \mu\text{M}$  dan harus selalu diatur pH 7,0. Konsentrasi yang tinggi akan menimbulkan ketidakseimbangan dengan enzim polimerase sedangkan pada konsentrasi rendah akan memberikan ketepatan dan spesifitas yang tinggi tanpa mereduksi hasil akhir.

Keenam, *gene cyclor* secara tepat meregulasi suhu dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduibilitas dan keakuratan reaksi amplifikasi. (Yuwono, 2005)

## **F. Elektroforesis**

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (*elektro*) sebagai penggerak molekul dan matriks penyangga berpori (*foresis*). Metode ini sangat umum digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan atau dibuat bermuatan. Molekul bermuatan bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dalam perangkat elektroforesis, gel

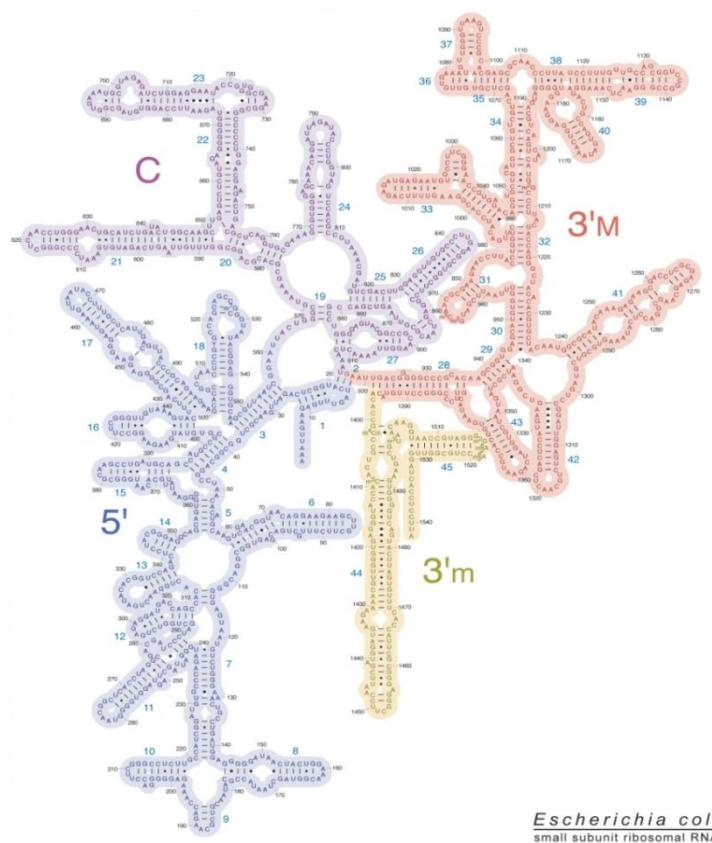
diletakkan di antara dua buffer chamber sebagai sarana menghubungkan kutub negatif dan kutub positif. (Yuwono, 2005; Fatchiyah dkk., 2011)

Elektroforesis biasanya memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul biologi. Media penyangga yang sering dalam elektroforesis antara lain kertas, selulosa asetat dan gel. Gel yang dipakai dapat berupa pati, agarosa atau poliakrilamida. Poliakrilamida dapat memisahkan protein dengan kisaran berat molekul 500-250.000 atau polinukleotida dengan kisaran 5-2000 bp. Ukuran pori pada gel poliakrilamida dapat dikecilkan dengan cara meningkatkan persentase total akrilamida (atau %T) atau dengan meningkatkan banyaknya ikatan silang (atau %C) dengan bis-akrilamida. Dalam perangkat elektroforesis, gel diletakkan di antara dua buffer chamber sebagai sarana menghubungkan kutub negatif dan kutub positif. Protein berukuran kecil lebih mudah dan cepat bergerak melalui pori pada gel dibandingkan dengan protein yang berukuran besar. Dengan demikian, protein terseparasi menjadi pita berdasarkan ukurannya, protein yang terseparasi divisualisasi menggunakan warna. (Fatchiyah dkk., 2011)

### **G. Universal Primer**

Identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi klinis secara tradisional dilakukan dengan isolasi organisme dan studi karakteristik fenotipik termasuk pewarnaan Gram, morfologi, kultur dan pengujian biokimia. Namun metode identifikasi bakteri memiliki banyak kelemahan.

Pertama, tidak dapat digunakan untuk organisme yang tidak dapat dikultur. Kedua, kita kadang-kadang dihadapkan dengan organisme yang menunjukkan karakteristik biokimia yang tidak cocok dengan pola dari setiap genus dan spesies yang dikenal. Ketiga, identifikasi organisme yang tumbuh lambat akan sangat lambat dan sulit. Sejak penemuan PCR dan sekuensing DNA, perbandingan sekuen gen dari spesies bakteri menunjukkan bahwa gen 16S rRNA sangat kekal dalam spesies dan antar spesies dari genus yang sama dan karenanya dapat digunakan sebagai “gold standard” untuk identifikasi bakteri ke tingkat spesies. (Woo dkk, 2003)

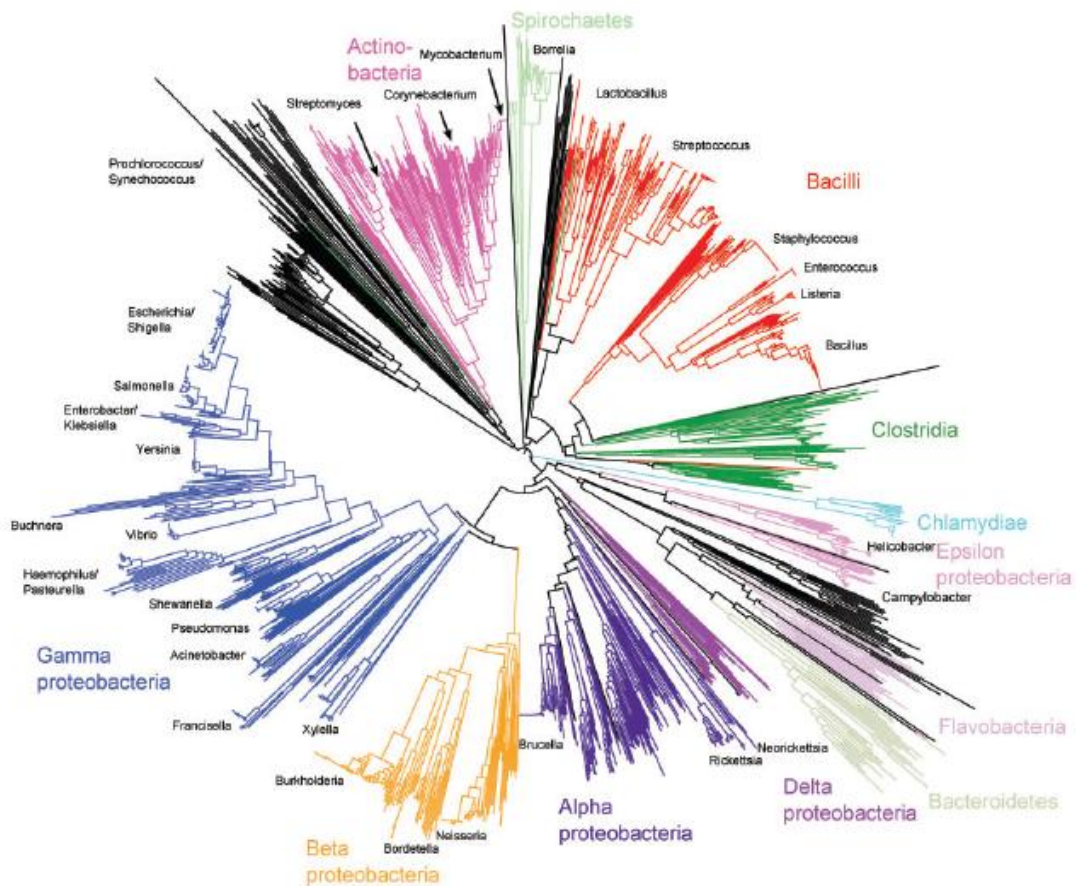


Gambar 4. 16S rRNA *Escherichia coli* (University California)

Pada tahun 1980-an, sebuah standar baru untuk mengidentifikasi bakteri mulai dikembangkan. Dalam laboratorium Woese dkk, menunjukkan hubungan filogenetik bakteri dan semua bentuk kehidupan, dapat ditentukan dengan membandingkan bagian yang stabil dari kode genetik. Calon daerah genetik pada bakteri termasuk kode gen yakni 5S, 16S (juga disebut subunit kecil) dan 23S rRNA dan ruang-ruang antar gen. Bagian dari DNA sekarang paling sering digunakan untuk tujuan taksonomi untuk bakteri adalah gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA dapat dibandingkan tidak hanya diantara semua bakteri tetapi juga dengan gen 16S rRNA dari archaeobacteria dan 18S rRNA gen eukariot. Kontribusi potensial bahwa 16S rRNA dapat membuat pemahaman klinis mikrobiologi dan penyakit menular. (Clarridge, 2004)

rRNA sangat penting untuk kelangsungan hidup semua sel, dan pengkodean gen rRNA sangat terjaga dalam bakteri dan kingdom lain. Urutan dari rRNA dan protein terdiri dari ribosom sangat terjaga sepanjang evolusi, karena mereka membutuhkan interaksi kompleks antar dan intramolekul untuk menjaga mesin sintesis protein. Akibatnya, penentuan perbedaan urutan gen 16S rRNA mapan sebagai standar metode untuk identifikasi dan klasifikasi filogenetik spesies prokariotik, genera, dan famili serta menyimpulkan evolusi dari organisme. Urutan rRNA gen dalam spesies dengan beberapa operon rRNA adalah identik atau hampir identik. Beberapa penelitian telah jelas menunjukkan kehadiran urutan heterogenitas antara rRNA operon dalam satu genom. (Sacchi, 2002)





Gambar 5. Kekerabatan bakteri hasil rekonstruksi gen 16S rRNA dari data genom 1663 strain (Jolley, 2012)

16S rRNA sebagai komponen penting dari fungsi sel, 16S rRNA juga target untuk beberapa agen antimikroba. Dengan demikian, mutasi pada gen 16S rRNA dapat mempengaruhi kerentanan organism untuk agen ini dan sekuen gen 16S rRNA dapat membedakan resistensi fenotip terhadap agen antimikroba. (Clarridge, 2004)

Urutan gen 16S rRNA memungkinkan identifikasi bakteri lebih akurat daripada yang diperoleh dengan pengujian fenotip, hasilnya tes kurang subyektif. Analisis 16S rRNA menyebabkan penemuan patogen baru, dapat mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur. Gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri, secara umum perbandingan urutan 16S rRNA memungkinkan diferensiasi antara organisme pada tingkat genus seluruh filum utama bakteri di berbagai tingkat, termasuk apa yang sekarang kita sebut spesies dan tingkat subspecies. (Clarridge, 2004; Muruyama, 2010)

Metode biologi molekuler seperti polymerase chain reaction (PCR) dapat menawarkan keuntungan metode pendeteksian yang lebih sensitive dan spesifik tanpa kultur yang memakan waktu. Target potensial adalah gen 16S rRNA, sekuen yang saat ini digunakan dalam taksonomi prokariota. Saat ini, analisis urutan komparatif gen 16S rRNA adalah metode yang paling umum digunakan dalam pembagian "filogenetik" prokariota. Gen 16S rRNA pada dasarnya adalah sebuah urutan nukleotida ~ 1500 bp karena molekul ini terlibat dalam fungsi seluler penting (biosintesis protein), gen 16S rRNA ada disemua sel prokariotik. (Martin dkk, 2010)

Variasi sekuen gen 16S telah digunakan sejak pertengahan 1980-an untuk mengkarakterisasi keberagaman mikroba. Pilihan primer yang optimal sebesar 96 nt menghasilkan 82-100 % klasifikasi yang terpercaya. Amplikon yang pendek mengurangi bias heterogenitas dan chimera.

Tingkat klasifikasi dan akurasi bervariasi antara lingkungan dan daerah sekuen karena referensi database menyediakan berbagai tingkat cakupan masing-masing lingkungan, tidak ada primer yang benar-benar “universal” dan daerah yang ditargetkan bervariasi informasinya. (Soergel, 2012)

PCR universal mampu mengamplifikasi sebagian dari 16S rRNA gen Eubacteria, termasuk *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria meningitidis*. (Lu, 2000)

Sekuen gen 16S rRNA panjang sekitar 1.550 bp, primer universal biasanya dipilih yang komplemen dengan daerah konservasi di awal gen dan di kedua wilayah 540 bp atau pada akhir dari seluruh sekuen (sekitar 1.500 bp). Meskipun 500 dan 1.500 bp panjang umum sekuen, sekuen dalam database dapat bervariasi panjangnya.

Secara umum perbandingan sekuen gen 16S rRNA memungkinkan diferensiasi antara organism tingkat genus seluruh filum utama bakteri, termasuk yang sekarang kita sebut spesies dan subspecies. Sekuensing

biasanya berhubungan dengan lebih dari satu spesies terkenal yang memiliki urutan yang sama atau sangat mirip. (Clarridge, 2004)

## **H. Sekuensing**

### **1. Dasar-dasar sekuensing**

Secara historis, ada beberapa metode untuk menentukan sekuen DNA. Genom DNA bakteri diekstraksi dari sel utuh dengan menggunakan metode standar atau sistem komersial (PrepMan DNA extraction reagent, ABI). DNA ini digunakan sebagai template untuk PCR dalam amplifikasi segmen sekitar 500 atau 1.500 bp sekuen gen 16S rRNA. Primer universal yang komplement digunakan untuk amplifikasi bakteri. Produk PCR dipurifikasi untuk menghilangkan kelebihan primer dan nukleotida. Beberapa kit komersial yang baik (misalnya Qiaquick PCR purification kit [Qiagen] dan Microcon-100 Microconcentrator columns [Millipore]).

Langkah selanjutnya adalah proses yang disebut siklus sekuensing. Hal ini mirip dengan PCR karena menggunakan DNA (produk pertama siklus PCR dimurnikan) sebagai template. Kedua sekuen forward dan reverse digunakan sebagai template dalam reaksi terpisah dimana hanya primer forward atau reverse yang digunakan. Siklus sekuensing juga berbeda dari PCR yakni tidak ada template baru yang terbentuk (template yang sama digunakan kembali untuk sebanyak siklus yang diprogram, biasanya 25 siklus) dan produk merupakan campuran DNA dari berbagai panjang. Hal ini dicapai dengan

menambahkan basa khusus yang berlabel disebut pewarna terminator (bersama dengan basa tanpa label) yang ketika secara acak bergabung dalam siklus kedua ini, sekuensing berakhir. Dengan demikian, fragmen dari berbagai ukuran dihasilkan. Empat basa label terminator memiliki pewarna fluorescent yang berbeda yang masing-masing menyerap panjang gelombang yang berbeda, basa terminal setiap fragmen dapat ditentukan dengan fluorometer.

Konsensus sekuen dibandingkan dengan database perpustakaan dengan menggunakan analisis software. Beberapa system memungkinkan perbandingan forward atau reverse. Database terkenal sekuen gen 16S rRNA dapat dikonsultasikan melalui World Wide Web adalah GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), the Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), the Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>), dan Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>). The proprietary MicroSeq 500 database bakteri (version 1.4.2) mencakup sekuen untuk 1.434 species atau subspecies dalam 235 genera. (Clarridge, 2004)

## **2. Permasalahan dalam sekuensing**

Munculnya generasi sekuensing bertepatan dengan pertumbuhan minat dalam menggunakan pendekatan ini untuk lebih

memahami peran struktur dan fungsi komunitas mikroba pada manusia, hewan dan kesehatan lingkungan. Penggunaan sekuensing 16S rRNA dalam sekuensing gen telah menghasilkan kontroversi seputar efek kesalahan sekuensing pada analisis hilir. 16S rRNA adalah gen yang paling terwakili di GenBank. Dalam ilmu biomedis, analisis gen 16S rRNA memiliki dampak yang signifikan terhadap pengetahuan kita tentang patogen baru termasuk agen penyebab penyakit.

Ada beberapa sumber bias dan kesalahan dalam sekuensing gen 16S rRNA. Adanya kekeliruan jumlah populasi mikroba dalam sampel, saat amplifikasi PCR, metode ekstraksi dan purifikasi DNA, pemilihan primer dan kondisi siklus. Jumlah salinan gen 16S rRNA per genom dapat mempengaruhi hasil sekuensing 16S rRNA. Polymerase PCR biasanya memiliki tingkat kesalahan 1 substitusi per 10-10 basa. Amplifikasi fragmen DNA dari template heterogen, ada resiko pembentukan chimera terhadap produk PCR. Pendekatan umum dalam mengurangi kesalahan sekuensing dan efeknya. Menghapus sekuen yang berkorelasi dengan kesalahan sekuensing dan memangkas sekuen yang berkualitas rendah. (Schloss dkk, 2011)

Meskipun teknologi tersebut sedemikian rupa sehingga membaca sekuen semakin akurat, kami memperkirakan bahwa mungkin ada kesalahan operator dalam mengedit pada 1 dari 5.000 hingga 1 dari 10.000 bp. Kesalahan pada tingkat ini tidak membuat perbedaan dalam nama spesies.

Beberapa laboratorium yang besar dan berpengaruh hanya menggunakan sekuen forward. Dalam salah satu penelitian terhadap 50 isolat, baik forward maupun reverse dapat digunakan untuk menetapkan identifikasi spesies yang benar dengan kurang dari 1 % perbedaan antara sekuen.

Basa tidak teridentifikasi yang tercatat sebagai N, R Y, W, M, S (yang berarti bahwa basa tidak diketahui A, G, C atau T. Ambiguitas 3 basa dengan melihat huruf B, D, H dan V. Polimorfisme intraseluler dapat menyebabkan kesulitan dalam memperoleh interpretasi sekuen yang mudah. BLAST lebih cepat tetapi kurang akurat daripada algoritma Needleman Wunsch. Database GenBank sangat luas yaitu mengandung pathogen dan strain manusia, hewan nonpatogen dan asal lingkungan. Meskipun ada consensus tidak pada tingkat yang tepat dari perbedaan genetik yang mendefinisikan spesies dengan algoritma matematika untuk menghasilkan data, dalam prakteknya 0,5 sampai perbedaan 1 % (99-99,5 %) sering digunakan. (Clarridge, 2004; Jonasson, 2002)

### **I. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Sejak penemuan kode genetik, penelitian biologi telah mengalami perubahan besar. Sampai awal abad kedua puluh, biologi difokuskan pada proses organisme hidup dan hampir selalu terlibat percobaan di laboratorium dan di lapangan. Pertumbuhan biologi molekuler pada abad kedua puluh pindah penelitian ke dalam tabung reaksi. Kemudian, dimulai

pada tahun 1970, para ilmuwan mulai mengumpulkan DNA dan data sekuen protein pada tingkat eksponensial, bahkan para peneliti saat ini telah menghasilkan sekitar 97 miliar basa sekuensing dan lebih dari 93 juta rekaman. Hebatnya, sekuen data ini dua kali lipat setiap 18 bulan. (Lobo, 2008)

Kesamaan sekuen dapat membantu dalam menyimpulkan fungsi dan hubungan evolusioner. Salah satu cara umum untuk memeriksa gen baru adalah mencari kesamaan antara sekuensing DNA baru dan database sekuen gen yang telah ada. Database sekuen gen dan protein tumbuh pada akhir abad kedua puluh, para ilmuwan beralih ke komputer untuk membantu menganalisa jumlah data yang berlimpah dan terus tumbuh. Hari ini, salah satu alat yang paling sering digunakan untuk menentukan urutan DNA dan protein adalah Basic Local Alignment Search Tool, juga dikenal sebagai BLAST. BLAST adalah algoritma komputer yang tersedia untuk penggunaan online di website National Center for Biotechnology Information (NCBI) dan banyak situs lainnya. BLAST dapat dengan cepat menyesuaikan dan membandingkan permintaan urutan DNA dengan database sekuen sehingga penting untuk penelitian genom yang sedang berlangsung. Perkembangan paralel proyek sekuen skala besar dan alat-alat bioinformatika seperti BLAST telah memungkinkan para ilmuwan untuk mempelajari cetak biru genetik kehidupan di banyak spesies dan telah membantu menjembatani



kesenjangan antara biologi dan ilmu komputer di bidang bioinformatika. (Lobo, 2008; Mount, 2004; Stapleton, 2012)

### **J. Perbandingan fenotip dan genotip**

Metode fenotip memiliki banyak kekuatan tetapi sering gagal karena dapat berubah dan bias penafiran. Tes fenotip memiliki beberapa masalah contohnya tidak semua strain dalam spesies tertentu menunjukkan karakteristik umum, strain yang sama dapat memberikan hasil yang berbeda pada pengujian ulang, database yang ada belum menyertakan spesies terbaru dan hasil tes tergantung pada penafsiran individu dan keahlian. Identifikasi fenotip memungkinkan identifikasi yang tidak tegas. (Bosshard, 2003; Petti, 2005; Zaloudikova, 2009)

Kategori fenotip serupa tapi genotip berbeda artinya bahwa ada lebih dari satu genotip untuk fenotip tertentu atau fenotip polifiletik, sekuensing gen 16S rRNA diposisikan untuk memecahkan. Identifikasi genotip membutuhkan database genetik yang akurat dan lengkap. (Tang, 1998; Clarridge, 2004)

Biaya merupakan isu penting dalam penggunaan sekuensing 16S rRNA sebagai alat diagnostik. Biaya awal peralatan dapat tergantikan dengan cepat dengan penghematan tenaga, waktu dan biaya perawatan. Biaya sekuensing akan menurun dengan cepat sehingga teknologi ini dapat dijangkau laboratorium mikrobiologi. (Tang, 1998; Clarridge, 2004; Jonasson, 2002)

## **K. Kerangka Konsep**

1. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1204/MENKES/ SK/X/2004 tentang persyaratan kesehatan lingkungan rumah sakit maka perlu penyelenggaraan kesehatan lingkungan rumah sakit sesuai persyaratan kesehatan.
2. WHO, 2002 menyatakan bahwa infeksi nosokomial yang paling sering adalah infeksi luka bedah, infeksi saluran kemih dan infeksi saluran pernapasan. Penelitian WHO menunjukkan bahwa prevalensi tertinggi infeksi nosokomial terjadi pada unit perawatan intensif (ICU), pasca bedah dan bangsal ortopedi . Angka infeksi yang lebih tinggi diantara pasien karena usia tua atau kemoterapi.
3. Kolmos, 2007 menyatakan bahwa penelitian di Odense Universitets Hospital tentang sumber dan rute infeksi bahwa infeksi berasal dari flora endogen pasien dengan pasien lain dan melalui petugas serta peralatan rumah sakit. Mikroba bertransmisi secara langsung dan tidak langsung melalui udara, air, makanan dan obat-obatan.
4. Femstrom, 2013 menyatakan bahwa patogen di udara tersebar melalui partikel atau droplet yang berasal dari kulit, saluran pernapasan bagian atas atau bawah, mulut hidung dan keadaan lain. Droplet pernapasan dapat membawa mikroorganismenya seperti bakteri dan virus, droplet yang cukup kecil tetap tersuspensi di udara untuk waktu yang lama dan masih menular.

5. Inweregbu, 2005 menyatakan bahwa beberapa penelitian telah dilakukan dalam mempelajari faktor resiko untuk kolonisasi bakteri gram negatif resisten antibiotik pada pasien PICU. Bakteri gram positif yang paling umum penyebab infeksi nosokomial adalah *Staphylococcus aureus* menjadi patogen dominan.
6. Hall, 2012 menyatakan bahwa Sebagian besar pasien MICU terinfeksi MRSA, sebelumnya mereka tidak memiliki riwayat MRSA. Frekuensi tertinggi kontak antara petugas kesehatan dan pasien (peluang untuk cross-transmisi). Secara keseluruhan, transmisi tidak langsung tampaknya berperan utama karena menyumbang lima perenam lintas transmisi.
7. Budiarti dkk, 2007 menyatakan bahwa jenis bakteri kontaminan udara di ruang perawatan sub bagian penyakit dalam Rumah Sakit Daerah Banjarbaru dengan metode kultur mengidentifikasi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus B hemolyticus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
8. Wu MJ, 2011 menyatakan bahwa monitoring kualitas udara di ruang perawatan Taichung Veteran General Hospital memperoleh angka kuman 55 hingga 600 cfu. Metode Real Time PCR mendeteksi bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial yakni *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan methicilli-sensitive *S. aureus*.
9. Lu Jang-Jih, 2000 PCR menyatakan bahwa primer universal mampu mengamplifikasi sebagian dari 16S rRNA gen Eubacteria, termasuk

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria meningitidis*. Kami telah merancang satu set primer tersebut dan menemukan bahwa universal PCR ini dapat mengamplifikasi semua bakteri yang telah kami kaji sampai saat ini.

10. Clarridge, 2004 menyatakan sekuensing mirip dengan PCR karena menggunakan DNA (produk pertama siklus PCR dimurnikan) sebagai template. Siklus sekuensing juga berbeda dari PCR yakni tidak ada template baru yang terbentuk. Menambahkan basa khusus yang berlabel disebut pewarna terminator.

11. Lobo, 2008 dan Mount, 2004 menyatakan BLAST adalah algoritma komputer yang tersedia untuk penggunaan online di website National Center for Biotechnology Information (NCBI) dan banyak situs lainnya. BLAST dapat dengan cepat menyesuaikan dan membandingkan permintaan urutan DNA dengan database sekuen sehingga penting untuk penelitian genom yang sedang berlangsung.

12. Clarridge, 2004 menyatakan GenBank, bank data terbesar nukleotida memiliki lebih dari 20 juta deposit sekuensing dan 90.000

diantaranya adalah gen 16S rRNA. Ini berarti bahwa banyak deposit sekuensing sebagai pembanding terhadap strain yang tidak diketahui.

