

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Burkholderia pseudomallei merupakan bakteri penyebab melioidosis dengan 90% kasus kematian akibat diagnosa belum ditegakkan dan 70% kasus kematian akibat pengobatan tidak efektif, sebagian besar terinfeksi dari lingkungan melalui ingesti, inhalasi, dan inokulasi. Melioidosis merupakan penyakit menular akibat infeksi bakteri *Burkholderia pseudomallei* yang endemik di negara tropis. Indonesia yang termasuk negara tropis berpotensi besar terjadinya *outbreak* melioidosis (Sarovich et al., 2014). Bahaya melioidosis yang berisiko kematian sangat tinggi dan ditambah belum ditemukannya vaksin maupun antibiotik yang tepat maka perlu dilakukan tindakan pencegahan dengan memutus rantai penularan dari lingkungan manusia.

Burkholderia pseudomallei merupakan agen penyebab penyakit melioidosis dan telah banyak dilaporkan di beberapa negara. Melioidosis terutama ditemukan di Asia Tenggara, Australia utara, Asia Selatan (termasuk India), dan Cina, dengan mayoritas kasus terdiagnosis di Thailand, Malaysia, Singapura, dan Australia utara. Laporan kasus juga muncul dari Papua Nugini dan Kaledonia Baru. Namun, di Indonesia, kasus melioidosis jarang dilaporkan; antara tahun 2013 dan 2014, tiga kasus diidentifikasi di provinsi Sulawesi Selatan, Kota Makassar. Pada tahun 2024, Provinsi Riau yang terletak di Pulau Sumatera dan berbatasan dengan Malaysia, Indonesia, melaporkan jumlah kasus melioidosis yang cukup tinggi. Penelitian ini menemukan bahwa angka kematian akibat melioidosis di Provinsi Riau adalah 41%, yang setara dengan 43% yang diamati dalam penelitian sebelumnya



di Indonesia dan lebih tinggi dari Cina (23%), Malaysia (33%), dan negara lain (Kusumawati et al., 2025)

Burkholderia pseudomallei merupakan kelompok bakteri patogen gram negatif. Bakteri ini sering digambarkan memiliki bentuk

Burkholderia pseudomallei bersifat oksidase positif. Bakteri ini

bersifat saprofit, bertransmisi dengan cara kontak dengan tanah dan air yang terkontaminasi. Patogen ini dapat masuk melalui inhalasi, aspirasi, serta melalui abrasi kulit (Tjampakasari, 2021). Di antara sekian banyak anggota genus *Burkholderia*, spesies *B. pseudomallei* merupakan yang paling patogen, bersama genus *B. mallei* serta *B. cepacia*. Selain menginfeksi manusia, *Burkholderia pseudomallei* mempunyai jangkauan infeksi yang cukup luas. Dilaporkan bahwa bakteri ini dapat menginfeksi hewan-hewan domestik seperti anak sapi, kambing serta babi.

Diagnosis melioidosis sulit dilakukan hanya berdasarkan gejala klinis saja. Diagnosis definitif melioidosis dengan mendapatkan hasil kultur *B. pseudomallei* yang positif, sehingga untuk menegakkan diagnosisnya memerlukan fasilitas yang relatif canggih, yang tidak tersedia di banyak daerah endemik *B. pseudomallei* terkadang sulit diidentifikasi dengan tepat, dan juga terkadang hanya dianggap sebagai kontaminan, sehingga dapat menyebabkan kesalahan dalam diagnosis. Karena perkembangan penyakit yang cepat dan kecenderungan *B. pseudomallei* untuk membentuk infeksi laten pengobatan melioidosis dibagi menjadi dua tahap: fase intensif intravena dan fase eradikasi untuk mencegah kekambuhan yang tujuannya adalah untuk mengurangi angka kematian, dan fase eradikasi, yang tujuannya untuk mengurangi risiko kambuh.

Oleh Chantratita et al., (2008) menjelaskan bahwa *Burkholderia pseudomallei* telah mengalami proses mikroevolusi pada tingkat gen sehingga terdapat perubahan pada urutan gen dalam genomnya dan menimbulkan adanya banyak variasi genetik dan secara fenotip menimbulkan perbedaan sifat dari kuman ini. Adanya perbedaan sifat fenotip dan genotip yang akan berhubungan dengan kemampuan adaptasi terhadap lingkungan tempat hidup dan pola penyebarannya, terutama perubahan tempat hidupnya yang secara evolusi pada mulanya hanya ditemukan pada lingkungan tanah dan sekarang adaptasi pada lingkungan tubuh manusia.



nya gen dengan karakteristik yang berbeda pada *Burkholderia* ng dapat berpengaruh atau berkontribusi pada fenotip, selain da faktor virulensi juga berpengaruh pada faktor penentu otik (Holden et al., 2004). Kemampuan dalam mengasimilasi

arabinosa yang diperankan oleh salah satu gen pada sistem sekresi dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* berhubungan dengan tingkat virulensi. Salah satu gen yang spesifik yang ditemukan pada genomnya adalah keberadaan gen Ara yang dapat memproduksi arabinosa.

Demikian pula dengan sifat resistensi pada berbagai antibiotik, *B. pseudomallei* secara intrinsik resisten terhadap beberapa golongan antibiotik yang biasanya efektif untuk pengobatan melioidosis termasuk penisilin, sefalosporin generasi pertama dan kedua, makrolida, rifamycins, colistin, dan aminoglikosida, tetapi biasanya rentan terhadap amoksisilin/asam klavulanat (AMC), kloramfenikol (CL), doksisisiklin (DOXY), sulfametoksazol (TS), ureidopenisilin, ceftazidime (CAZ), dan karbapenem (Bugrysheva et al., 2017)

Gen Ara adalah gen yang mengkode sintesis enzim arabinose yang akan digunakan oleh kuman ini dalam metabolisme karbon arabinosa. Dari berbagai hasil penelitian diketahui bahwa dalam penggunaan sumber karbon arabinosa ternyata tidak semua dari kuman ini mampu menggunakan arabinosa (Moore et al., 2004). Keberadaan dari gen Ara ternyata berhubungan erat sifat virulensi dari kuman ini. *B. pseudomallei* yang mempunyai gen Ara⁺ bersifat avirulen sedangkan kuman yang mempunyai gen Ara⁻ ternyata sangat virulen. Gen Ara⁻ merupakan Strain yang tidak mampu mengasimilasi arabinosa yang lebih virulen sedangkan gen Ara⁺ adalah strain yang dapat mengasimilasi arabinosa. Sehingga ada hubungan yang signifikan antara gen Ara dengan kemampuan virulensi yang menimbulkan penyakit melioidosis.

Seperti diuraikan sebelumnya bahwa *Burkholderia pseudomallei* juga sama bakteri penginfeksi lainnya yang cenderung mengalami resistensi terhadap antibiotik. *Burkholderia pseudomallei* dilaporkan juga telah banyak kasus yang resistensi terhadap antibiotik ceftazidime.



Gen *penA* merupakan sebuah gen yang terletak pada kromosom *pseudomallei* yang mengkode enzim penicillin-binding protein 3 target utama antibiotik β -laktam. Mutasi atau perubahan asam 4 dapat mengakibatkan penurunan afinitas β -laktam terhadap a menyebabkan resistensi terhadap beberapa antibiotik β -x ceftazidime, yang merupakan lini pertama terapi melioidosis.

Mekanisme ini telah dilaporkan dalam berbagai studi, di mana mutasi substitusi asam amino pada gen *penA* berhubungan dengan peningkatan MIC (Minimum Inhibitory Concentration) terhadap ceftazidime (Sarovich et al., 2012; Viberg et al., 2023).

Banyaknya kasus infeksi di Makassar dengan gejala klinis serupa dengan penyakit melioidosis seperti pada kasus dengan septikemia yang berakibat fatal mengindikasikan bahwa kuman ini telah lama menginfeksi manusia (Munir, 2020; Tauran et al., 2015). Keberadaan kuman *Burkholderia pseudomallei* sangat perlu diketahui di kota Makassar terutama diversitas genetik dari kuman ini sehingga dapat diketahui dan dapat dibandingkan dengan kuman yang sama pada daerah endemik melioidosis. Diversitas genetik dapat berkaitan dengan pola penyebaran di lingkungan sehingga potensi terjadinya melioidosis dapat diketahui. Berdasarkan hal tersebut diperlukan adanya penelitian eksploratif untuk melihat keberadaan bakteri *Burkholderia pseudomallei* di Makassar, serta mendeteksi gen Ara bakteri *Burkholderia pseudomallei* yang berperan sebagai faktor tingkat virulensi melioidosis dan menganalisis hubungan resistensi *ceftazidime* dengan keberadaan gen *penA* sebagai salah satu gen yang mengkode faktor resistensi dari isolat klinis *Burkholderia pseudomallei*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian yang saya lakukan adalah sebagai berikut:

1. Apakah dari beberapa isolat klinis *B. pseudomallei* yang diisolasi di Makassar mempunyai gen Ara sebagai faktor virulensi penyakit melioidosis ?
2. Apakah dari beberapa isolat klinis *B. pseudomallei* yang diisolasi di Makassar mempunyai gen resisten β -Laktam (*penA*) sebagai li resistensi ceftazidime ?



1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

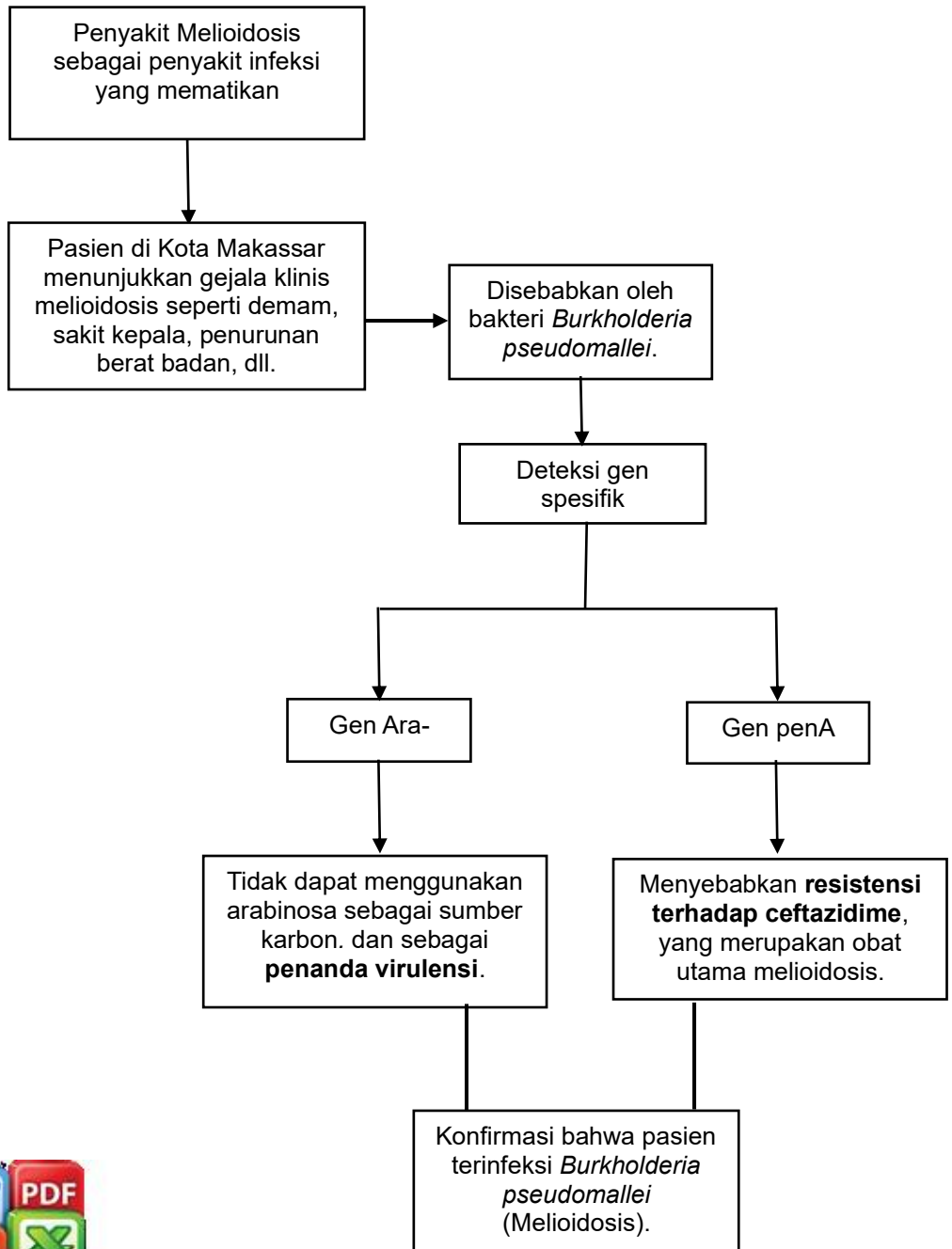
1. Untuk Menganalisis adanya gen Ara- sebagai faktor virulensi penyakit melioidosis dari isolate klinis *B. pseudomallei* yang diisolasi di makassar.
2. Untuk menganalisis adanya gen penA sebagai penyandi resistensi ceftazidime dari isolate klinis *B. pseudomallei* yang diisolasi di makassar.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keberadaan, distribusi dan keragaman genetis dari *Burkholderia pseudomallei* yang berasal dari isolat klinis yang dapat menyebabkan penyakit melioidosis di Makassar. Dengan diketahuinya strain *B. pseudomallei* yang mempunyai gen Ara maka dapat diketahui jenis kuman yang virulen yang dapat ditemukan pada isolat klinis yang dengan mudah dapat menginfeksi manusia. Dengan terdeteksinya strain yang virulen *B. pseudomallei* dari isolat maka infeksi terhadap manusia dapat saja terjadi sehingga hal ini bisa menjadi pertimbangan bagi paramedis dalam melakukan pengobatan dengan tepat karena diketahuinya secara genetik salah satu dari bakteri *B. pseudomallei*.



1.5 Kerangka Pikir



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif eksperimental, yang bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *ara-* dan *penA* pada isolat *Burkholderia pseudomallei* dari pasien di Makassar, menggunakan metode PCR berbasis DNA sebagai teknik utama dalam identifikasi molekuler.

2.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2024 di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains FMIPA Universitas Hasanuddin.

2.3 Alat dan Bahan

2.3.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, Bunsen, pipet, incubator, botol transport, oven, tabung reaksi, otoklaf, ose bulat, pipet, tube, vortex shaker, Waterbath, tabung Eppendorf, pompa vacuum, rak tabung Eppendorf, sentrifuse Hama Z 229, alat sentrifugasi dingin (Heraeus MinifugeT), inkubator putar, spoit, botol sampel, mikropipet, botol reagen, gelas kimia, batang pengaduk, neraca analitik, sarung tangan, stopwatch, erlenmeyer, mikropipet (*Single channel* 5-25 µl; 25-50 µl; 50-100 µl) (*Multichannel* 25-50 µl; 50-150 µl), inkubator putar, freezer 20°C, lemari pendingin 4°C, perangkat lampu ultraviolet + kamera digital, Elektroforesis + tip supply, kaca, mikropipet + tip filter, microtube, rak tabung reaksi kecil.

2.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel dahak, medium AshDown, medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), emisolid Indol Motility), Medium MRVP (Methyl Red Voges dium SCA (Simmon Citrate Agar), medium MHA (Mueller eaksi indol (kovaks), larutsn metill alcohol, larutan alfa naftol, 0%, kertas label, buffer lisis, buffer tris EDTA (TE),



Paraffin/mineral oil, marker (Smart Ladder SF), gel agarose 2%, Buffer TE (Tris Borat EDTA) 10x, larutan loading 6x (Takara), EtBr (Ethidium Bromida), Megamix Blue Microzone, Extract kit DNA Microlysis PLUS, Pure Taq Ready To Go PCR Beads, primer gen *ara*- dan primer gen *penA*.

2.4 Jenis Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yang diperoleh secara langsung dari hasil pemeriksaan laboratorium terhadap isolat klinis *Burkholderia pseudomallei*.

Data yang dikumpulkan terdiri dari:

- **Data kualitatif**, berupa keberadaan atau tidaknya gen *ara*- dan *penA* berdasarkan hasil visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa. Keberadaan pita DNA menunjukkan hasil positif (+), sedangkan tidak adanya pita menunjukkan hasil negatif (-).
- **Data kuantitatif deskriptif sederhana**, berupa jumlah isolat yang menunjukkan hasil positif terhadap gen target, yang kemudian dihitung dalam bentuk persentase dari total isolat yang diperiksa.

2.5 Kriteria Sampel

2.5.1 Kriteria Inklusi

- Sputum pasien rawat inap/jalan dengan gejala batuk berdahak disertai sakit kepala dan nyeri dada
- Demam lebih dari 2 hari
- Penurunan berat badan
- Diare, *Jaundice* (Penyakit kuning)
- Terdapat luka, borok atau abses
- Pasien yang bersedia menjadi responden dalam penelitian, dan serta dapat persetujuan dari pihak tersebut



Kriteria Eksklusi

- Pasien rawat inap/jalan tanpa gejala
- Pasien sedang mengkonsumsi antibiotik
- Pasien dengan air liur
- Pasien dengan kontaminasi

2.6 Pengambilan Sampel

Penelitian ini mencakup 21 sampel yang diperoleh dari RSUD Labuang Baji Makassar. Sampel yang diambil berupa sputum dikumpulkan dari individu yang diduga menderita melioidosis. Pengambilan sampel dilakukan oleh dokter, perawat, atau profesional Kesehatan.

2.7 Persiapan Sampel

Sampel-sampel ini dikumpulkan dengan metode yang tepat untuk menghindari kemungkinan kontaminasi. Sampel diangkat dengan usapan steril ke laboratorium Penelitian Dan Pengembangan Sains FMIPA UNHAS, dan setiap sampel diinokulasi menggunakan metode inokulasi langsung pada Mac-Conkey Agar, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam kondisi aerobik selama 18-24 jam.

2.8 Kultur Bakteri *B. pseudomallei*

Koloni tunggal diisolasi dari setiap kultur positif primer dari MacConkey Agar dan kultur diisolasi kembali ke dalam medium spesifik *Burkholderia pseudomallei*, Medium Ashdown untuk mendapatkan kultur murni dan kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan kulturnya (pewarnaan gram, bentuk koloni, ukuran, warna,) dan bakteri diwarnai dengan pewarnaan Gram dan diperiksa di bawah mikroskop. Sampel dituangkan ke dalam media Ashdown Broth dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya inokulum diambil sebanyak 1 ose, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi medium Ashdown Agar yang telah memadat, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. koloni bakteri yang diduga *Burkholderia pseudomallei* berdasarkan ciri-ciri pertumbuhan koloninya dengan koloni merah muda keunguan pengujian biokimia meliputi uji indol, uji katalase, H₂S.

2.9 Deteksi gen Ara- dan gen penA dengan Menggunakan Kit Ekstraksi Microlysis

2.9.1 Isolasi DNA dengan Menggunakan Kit Ekstraksi Microlysis



dimasukkan kedalam tabung *ependorf* 1,5 ml dan 0 ul buffer GA, kemudian ditambahkan 20 ul proteinase K rtex. Ditambahkan 200 ul larutan buffer GB mix dengan vortex ada suhu 70°C selama 10 menit, dimana tiap 2 menit divortex.

0 ul ethanol (96-100 %) ke dalam sampel dan mix semuanya

dengan vortex hingga 15 detik. Dipipet semua campuran kedalam spin column CB3 dan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Dibuang semua cairan dan ditempatkan spin column ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan 500 ul Buffer GD ke spin column CB3, dan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Kemudian dibuang semua cairan dan ditempatkan spin column ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan 600 ul Buffer PW ke spin column CB3 dan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Dibuang semua cairan dan ditempatkan spin column ke dalam tabung pengumpul. Sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit hingga membrane kering sempurna. Ditempatkan spin column CB3 ke tube 1,5 ml yang baru dan pipet 50-200 ul Buffer TE, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 15-25°C selama 2-5 menit. Kemudian sentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. cairan yang terdapat pada tabung *efendorf* 1,5 ml merupakan DNA produk dari sampel yang telah diekstraksi dan siap untuk di PCR.

2.9.2 Amplifikasi DNA dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction*

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi. Sebelumnya dibuat campuran reaksi gen Ara- untuk PCR yaitu NFW 50 µl, masing-masing 25 µl primer Bp16S-42L (CGGCAGCRCGGGCTTCGG) dan Bps16S-427R (CACTCCGGGTATTAGCCAGA) dengan gen target 243bp-450bp dan serta ditambahkan 200 µl Taq polymerase. Selanjutnya disiapkan tabung 0.5 ml (sesuai dengan jumlah sampel yang akan diimplifikasi). Tabung kemudian diisi campuran reaksi PCR sebanyak 12 µl lalu masing-masing tabung ditambahkan 3 µl ekstrak DNA. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dan setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 57°C selama 1 menit, extending pada suhu 72°C selama 1 menit dan post extending pada suhu 72°C selama 10 menit. Kemudian elektroforesis gel dilakukan pada produk PCR menggunakan agarosa 1,5%.



nya Amplifikasi PCR gen *penA* diekstraksi menggunakan kit Qiagen (Qiagen, USA) dengan menggunakan primer (5'-3');
(CGCCACAAATTCGCACGCAC) dan *penA_R*
(CTCCGTGAAC) dengan target 124 bp. Amplifikasi PCR
25 µL campuran yang mengandung 1X buffer PCR, 2 mM

MgCl₂ 2, 0,2 mM dNTP 2,5 U Taq DNA polymerase, dan 2 µL cetakan DNA. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dan setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, pada suhu 95°C selama 1 menit, Anneling pada suhu 55°C selama 30 detik, extending pada suhu 72°C selama 1 menit, diikuti dengan post extending pada suhu 72°C selama 10 menit. Kemudian elektroforesis gel dilakukan pada produk PCR menggunakan agarosa 1,5%.

2.9.3 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

Masing-masing 0,6 µl produk amplifikasi dicampur dengan 4 µl larutan loading. Setelah tercampur dengan baik masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang terendam dalam tangki yang berisi TAE *buffer*. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 2 jam dengan tegangan konstan 120 volt. Setelah 2 jam, elektroforesis dihentikan dengan gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar dengan marker 400 bp yang sesuai dengan panjang basa 63F dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

2.10 Sekuensing Produk PCR

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dilakukan sekuensing DNA dilakukan oleh 1st Base melalui PT Genetika Indonesia. Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode Sanger dideoksi

2.11 Uji Sensitivitas Antibiotik

Pemeriksaan sensitivitas antibiotik menggunakan metode difusi cakram. Koloni disuspensikan pada tabung standar 0,5 McFarland dan didifusikan pada permukaan agar Mueller Hinton. Pengujian dilakukan menggunakan cakram antibiotik Ceftazidime.

2.12 Analisis Data



Data hasil penelitian diolah dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk grafik. Hasil sekuensing dalam bentuk urutan nukleotida menggunakan program GENETYX versi 7 untuk mengetahui urutan DNA dengan sekuen DNA *B. pseudomallei* yang ada di Bank lm.nih.gov dan www.sanger.ac.uk