

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Munculnya *Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae* (CPE) di wastafel rumah sakit merupakan tantangan kesehatan masyarakat yang signifikan di Indonesia, mencerminkan tren global yang lebih luas terkait peningkatan resistensi antibiotik. Bakteri resisten *carbapenem*, terutama yang memproduksi enzim *carbapenemase*, telah menjadi endemik di banyak fasilitas kesehatan, menyebabkan infeksi serius yang sulit diobati karena terbatasnya pilihan antibiotik yang efektif.(Codjoe & Donkor, 2017). Penelitian di RS.Sardjito,Indonesia, menemukan prevalensi bakteri resisten *carbapenem* tertinggi ditemukan 46,43%-70% *carbapenem* resisten *Acinetobacter baumannii*, diikuti *Pseudomonas aeruginosa* dengan prevalensi 12,82%-23,33%, dan *carbapenem* resisten *Enterobacteriales* dengan prevalensi 0,73%-8,24%.(Primasari et al., 2022). Studi *carbapenem non susceptible Pseudomonas aeruginosa* (CNPA) di RS.Cipto Mangunkusumo,Jakarta,melaporkan 17/412 (4,1%) pasien membawa CNPA pada saat masuk ICU dan 34/395 (8,6%) menjadi positif selama masa inap di ICU, terdapat pula 12 (75,0%) CNPA dari 16 isolat lingkungan. (Saharman et al., 2019) gen OXA51 pada 50 isolat *A. baumannii*, paling banyak dari sampel sputum (60%). (Zuchrullah & Nurdin, 2024).

Healthcare-associated infections (HAIs) di rumah sakit dapat terjadi sebagai akibat langsung dari intervensi medis atau dari paparan lingkungan perawatan kesehatan. (De Geyter et al., 2017). HAIs juga dikenal sebagai infeksi nosocomial (Mekdade, 2022; Canada, 2023), atau *hospital-acquired infections* adalah infeksi dengan gejala yang timbul saat masih dirawat yang gejala prodromal belum ada saat mulai dirawat atau sudah keluar dari rumah sakit (Mekdade, 2022) sebagai komplikasi akibat tindakan medis (South Australia, 2023) yang terjadi pada penderita yang dirawat inap di rumah sakit dengan penyakit bukan infeksi (Mekdade, 2022) tanpa gejala saat masuk rumah sakit (Monegro et al., 2023), disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus (South Australia, 2023 ; Sikora & Zahra, 2023) dan fungi (Machado et al., 2022).

Dalam 20 tahun terakhir, ada 32 kasus organisme yang resisten terhadap *carbapenem* yang dilaporkan di lingkungan air rumah sakit (Kizny Gordon et al., 2017). Saluran air, wastafel, dan keran adalah area yang paling sering dikolonisasi, dengan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai organisme yang paling sering diidentifikasi(Kizny Gordon et al., 2017) .Banyak penelitian telah mengindikasikan bahwa wastafel adalah sumber signifikan dari *Carbapenemase Producing Organism* (termasuk *Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae* (CPE), *Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii* (CRAB), dan *Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) yang ditularkan ke pasien (Kizny Gordon et al., 2017; Van Loon et al., 2021).



Di antara reservoir lingkungan yang mungkin ada di rumah sakit, saluran pembuangan wastafel semakin dikenal sebagai sumber signifikan untuk pasien rawat inap yang resisten terhadap berbagai macam infeksi kesehatan. (Kizny Gordon et al., 2017; Van Loon et al., 2017; Van Loon et al., 2021). Dalam sebuah penelitian, ditunjukkan bahwa mikroorganisme akan terdistribusi ke wastafel yang terkontaminasi dan permukaan saluran air lainnya sebagai tetesan besar yang dihasilkan selama penggunaan

keran (Kotay et al., 2019). Organisme yang terkait dengan tetesan ini tetap hidup, berpotensi mencemari permukaan di sekitar mangkuk wastafel (Kotay et al., 2019).

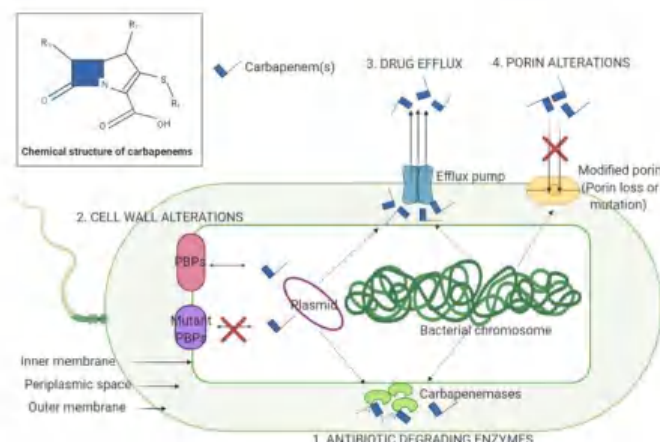
Carbapenemase Producing Organism (CPO) menjadi perhatian dunia karena morbiditas dan mortalitas yang terkait dengan bakteri Gram negatif yang resisten ini (Regev-Yochay et al., 2024). Sebuah studi di rumah sakit Israel, yang melibatkan 132 kasus di mana kesesuaian *Carbapenemase Resistant Enterobacteriaceae* wastafel-pasien diamati, strain bakteri dianalisis untuk kesamaan genetik (Regev-Yochay et al., 2024). Di antara kasus-kasus ini, 36,4% menunjukkan pola yang sama pada spesies bakteri yang berbeda dengan berbagai gen resistensi (Regev-Yochay et al., 2024). Dalam banyak kasus, kontaminasi wastafel didokumentasikan sebelum pasien dirawat di rumah sakit, yang menunjukkan rute transmisi wastafel-ke-pasien (Regev-Yochay et al., 2024). Meskipun perangkat wastafel yang terkontaminasi diganti beberapa kali, kontaminasi ulang dengan strain yang sama terjadi dengan cepat. Dalam beberapa kasus, strain yang berbeda yang membawa gen resistensi yang sama terdeteksi selama beberapa minggu berturut-turut (Regev-Yochay et al., 2024). Kontaminasi CPE di lingkungan rumah sakit terutama wastafel di ruangan perawatan pasien yang berisiko tinggi seperti ruangan gawat darurat, intensif unit dan perawatan luka perlu dideteksi dan dilakukan pencegahan karena dapat dengan cepat menyebar luas dan menimbulkan dampak kepada pasien. (Kim et al., 2022). Beberapa spesies CPE juga diisolasi dari pipa drainase yang terletak di bawah dispenser air dan di saluran pembuangan terkontaminasi unit kardiologi di *Asan Medical Center* di Seoul, Korea Selatan (Jung et al., 2019). Spesies yang diisolasi termasuk *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* dan *E. coli*. Dalam hal ini, alel *carbapenemase* KPC dan NDM-1 paling sering terdeteksi (Jung et al., 2017).

Ada empat kategori mekanisme umum resistensi antibiotik, salah satunya dengan memodifikasi enzimatis yaitu menghasilkan enzim *carbapenemase*. Resistensi terhadap *carbapenem* dapat dikaitkan dengan tiga mekanisme utama lain: resistensi yang diperantarai oleh porin untuk mengurangi penyerapan *carbapenem*, pompa *efflux*, yang memompa *carbapenem* di luar sel dan resistensi oleh enzim yang dimediasi melalui akuisisi gen *carbapenemase*. Penurunan penyerapan atau peningkatan *efflux* antibiotik biasanya dikaitkan dengan ekspresi berlebih dari β -laktamase yang memiliki afinitas lemah untuk *carbapenem* seperti pada gambar 1.1 (Baylay et al., 2020; Elshamy & Aboshanab, 2020; Vrancianu et al., 2021). Enzim *carbapenemase* dapat menghidrolisis *carbapenem*, dan membuat antibiotik tidak efektif. (Aurilio et al., 2022; Armstrong et al., 2021). Organisasi kesehatan, seperti *the Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dan *the World Health Organization* (WHO), telah mengidentifikasi *Carbapenemase Resistant Enterobacteriaceae* (CRE) yang sebagai salah satu ancaman paling kritis yang terkait dengan masalah resistensi antibiotik yang



adalah enzim β -laktamase spesifik yang memiliki kemampuan antibiotik golongan *Carbapenem* (Queenan & Bush, 2007), kan molekuler yang bervariasi menurut Ambler menjadi kelas A (mis *bla*-betalactamase (seperti NDM, IMP, VIM dan SPM) serta kelas D (mis *bla*-oxacillinase). Ekspresi gen resisten antibiotik terjadi karena mutasi atau rekombinasi genetik yang dimediasi oleh *transposon*, *plasmid*, atau *integron*.

Beta-lactamase menghambat fungsi antibiotik dengan memecah strukturnya. Hal ini terjadi melalui reaksi hidrolisis di mana ikatan amida pada antibiotik *beta-lactam* dibelah. Akibatnya, antibiotik tidak dapat bekerja pada *protein binding penicillin* (PBP) sehingga antibiotik tidak dapat menjalankan fungsinya (Sawa et al., 2020).

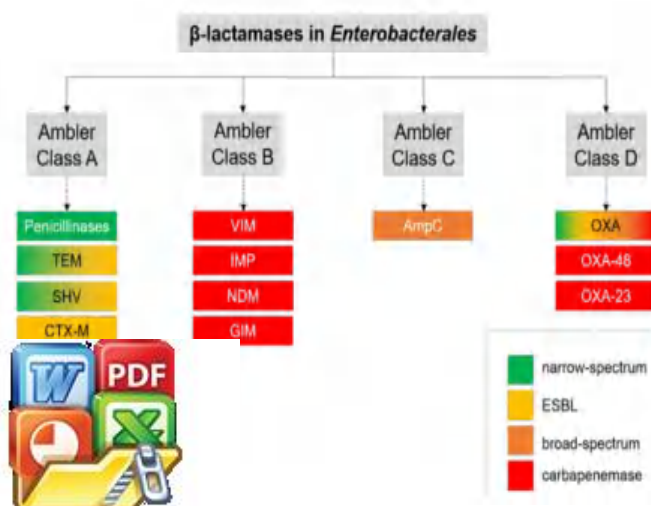


Gambar 1.1. Mekanisme Resistensi Antibiotik Carbapenem

Sumber : Vrancianu et al., 2021.

Pembagian molekuler gen *carbapenemase* menurut Ambler seperti gambar 1.2 (Elshamy & Aboshanab, 2020) yaitu :

- *Carbapenemase* Kelas A dan D: Kelas ini menggunakan mekanisme berbasis serin untuk hidrolisis. Contoh penting termasuk *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) dan enzim lain seperti IMI dan GES (Baylay et al., 2020).
- *Carbapenemase* Kelas B: Ini adalah *metallo-beta-laktamase* yang membutuhkan seng di tempat aktifnya untuk aktivitas enzimatik. Mereka dicirikan oleh kemampuannya untuk menghidrolisis berbagai macam *beta-lactam*, termasuk *carbapenem* (Baylay et al., 2020).



si Betalactamase menurut Ambler
ster et al., 2021)

Enzim *carbapenemase* yang paling umum ditemukan adalah *Imipenemase (IMP)*, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)*, dan *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM)*, *New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)*. (Kizny Gordon et al., 2017; Weingarten et al., 2018) (Elshamy & Aboshanab, 2020). Gen yang mengkode *carbapenemase* penting, seperti *Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)*, *oxacillinase-48 (OXA-48)*, dan *Metallo- β -laktamase*, sering ditularkan antar organisme oleh elemen genetik yang bergerak (*plasmid*) (Kizny Gordon et al., 2017). Perpindahan *plasmid* secara horisontal menyebarkan mekanisme resistensi pada bakteri lain, dan memahami ekologi *plasmid* pada lingkungan rumah sakit dapat membantu dalam merancang strategi pengendalian untuk mencegah infeksi nosokomial. (Weingarten et al., 2018).

Distribusi global berbagai gen penyandi *carbapenemase* dalam CPE. *Carbapenemase* telah muncul di sebagian besar wilayah di seluruh dunia. KPC adalah *carbapenemase* yang paling umum dan terutama lazim di Tiongkok, Amerika Serikat, Italia, dan sebagian besar wilayah Amerika Selatan; NDM terutama lazim di Tiongkok, Pakistan, India, dan Bangladesh, dan tersebar luas di seluruh dunia; IMP terutama lazim di Jepang dan Taiwan, Tiongkok; VIM terutama lazim di Yunani; OXA terutama mengacu pada OXA-48, dan terutama lazim di Turki, Maroko, dan negara-negara Eropa (Prancis, Jerman, Belanda, Italia, Inggris, dan sebagainya); dan berbagai *carbapenemase* yang tersebar secara lokal di Eropa (gambar 1.3) (Nordmann & Poirel, 2019). Namun terdapat keterbatasan data epidemiologi wastafel yang terkontaminasi *carbapenemase* di Indonesia terutama di kota Makassar.



Gambar 1.3 Epidemiologi gen penyandi carbapenemase.
Sumber : Nordmann & Poirel, 2019; Cui et al., 2019)



ekuler memiliki sensitivitas dan spesifisitas tertinggi untuk tensi dan dapat diterapkan pada isolat yang dikultur atau langsung (Noster et al., 2021). Metode ini dapat memberikan informasi yang is enzim *carbapenemase* dan memiliki waktu yang relatif singkat hasil (Noster et al., 2021). Tes berdasarkan teknik molekuler ndar emas untuk identifikasi gen carbapenemase. (Nordmann et al.,

Detection methods	Advantages	Limitations
Phenotypic detection assays		
Modified Hodge test (MHT)	1. Detecting KPC 2. Simple and inexpensive	1. False-positive and false-negative 2. Insufficient for MBLs 3. Time consuming
Colorimetric assay	1. Detecting KPC and most MBLs 2. Type carbapenemases 3. Simple and inexpensive	1. Insufficient for OXA-48 2. Specific reagents 3. Various infecting factors
Modified carbapenem inactivation method (mCIM)	1. Detecting all carbapenemases 2. Clear criteria of judgment 3. Simple and cost-effectiveness	1. Time consuming
Spectrophotometric method	1. High sensitivity and specificity 2. Time saving 3. Simple and inexpensive	1. Specific instrument (spectrophotometer) 2. Various influencing factors 3. No standard equation and cut-off value 4. Small sample size
MALDI-TOF-based methods	1. Detecting KPC and NDM 2. Time saving 3. Easy to perform 4. Low measurement cost	1. Insufficient for OXA-48 2. No clear protocol and standard analysis 3. Expensive equipment
Molecular-based detection methods	1. Gold standards 2. Detecting all carbapenemases genes 3. Type carbapenemase genes 4. Time saving	1. High technical requirements 2. Insufficient for expression of genes 3. High measurement cost

Tabel.1.1 Metode tes carbapenemase

Sumber : (Cui et al., 2019)

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan *carbapenemase* pada wastafel di ruang gawat darurat (IGD), ruang rawat intensif (ICU) dan ruang rawat inap bedah dengan menggunakan metode molekuler di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu penyebab terjadinya *Healthcare-associated infections* (HAIs) di rumah sakit akibat dari paparan lingkungan perawatan kesehatan, dimana bakteri yang sering ditemukan adalah bakteri negatif-Gram yang resisten *carbapenem*. Salah satu mekanisme resistensinya yaitu menghasilkan enzim *carbapenemase* yang ditemukan di wastafel di rumah sakit.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah: “Apakah dapat terdeteksi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif-Gram pada wastafel di ruang IGD, ICU, Rawat Inap di rumah sakit umum di kota Makassar? “



1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengidentifikasi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada wastafel di ruang IGD, ruang ICU dan ruang Rawat inap terutama Bedah di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui proporsi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada wastafel di ruang IGD di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.
2. Untuk mengetahui proporsi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada wastafel di ruang ICU di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.
3. Untuk mengetahui proporsi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada wastafel di ruang Rawat Inap terutama RI Bedah di Rumah Sakit umum di kota Makassar.
4. Untuk mengetahui bakteri Negatif Gram yang membawa gen penyandi *carbapenemase* pada wastafel di ruang IGD, ruang ICU dan ruang Rawat Inap terutama RI Bedah di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang pola penyebaran gen penyandi *Carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram pada wastafel di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

1.4.2 Manfaat Untuk Instansi Kesehatan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi rumah sakit tentang pentingnya mendeteksi adanya gen penyandi *carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram di lingkungan rumah sakit termasuk wastafel, sehingga dapat digunakan sebagai tindakan pencegahan untuk meminimalisir terjadinya infeksi nosokomial. Dengan memahami mekanisme resistensi akan membantu dalam mencegah dan mengendalikan penyebaran resistensi antibiotik. Disamping itu, dapat memberikan data mengenai gen *carbapenemase* di Rumah Sakit umum sehingga Dinas kesehatan dapat membuat kebijakan terkait pencegahan dan pengendalian infeksi.



1.4.3 Manfaat Untuk Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi, menambah wawasan serta pengalaman meneliti dan menulis bagi peneliti.

1.5 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian ini adalah penelitian genetik tentang gen penyandi *carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

1.6 Kebaruan Penelitian

Penelitian tentang adanya gen penyandi *carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram dari wastafel rumah sakit umum di Indonesia khususnya di kota Makassar belum ada. Oleh karena itu penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data terkait gen *carbapenemase* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dari wastafel rumah sakit umum di kota Makassar



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observatif dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan mengetahui adanya gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada spesimen *swab* wastafel di Rumah Sakit Umum di kota Makassar.

2.2 Waktu dan Tempat

2.2.1 Waktu Penelitian

Pengambilan sampel *swab* pada wastafel di Rumah Sakit Umum di kota Makassar dan identifikasi molekuler dilakukan dalam kurun waktu Juli 2024 - Agustus 2024.

2.2.2 Tempat Penelitian

1. Pengambilan sampel *swab* pada wastafel di Rumah Sakit Umum di kota Makassar (IGD, ICU dan Rawat inap terutama bedah)
2. Identifikasi molekuler gen *carbapenemase* spesimen *swab* wastafel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2.3 Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 2.1 Alat Penelitian

No	Nama Alat	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Mesin PCR	Biorad	1 buah
2	Gel DOC		1 buah
3	Mesin Elektroforesis		1 buah
4	<i>Sentrifuge</i>		1 buah
5	<i>Waterbath</i>		1 buah
6	<i>Laminal Flow</i>		1 buah
7	BSC Tipe II		1 buah
8	Mikropipet (1000 ul, 100ul, 20ul, 10ul)		1 pcs
9	Cetakan Agarosa		
10	Tips(1000ul, 100ul,20ul,10ul)	<i>Universal fit bulk packed pipet tips,yellow,nonsterile. Corning</i>	1000 pcs
	eppendorf 5 ml	500 pcs/box.Brand	1 box
	Gelas Ukur	Vol 0,2 ml, <i>non-sterile,clear</i> ,960 pcs per box, Corning	1 box



- **Bahan Penelitian**

No	Nama Bahan	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Swab Amies Agar Gel	PK-TS0001A, Copan, Citoswab	150 buah
2	MacConkey Agar 500 gram	Liofilchem-L-610028	1 botol
3	Petri dish 3 vent 90x15 mm	Thermo; 101VR20	1 box
4	DNA Extraction Kit	gSYNC™ DNA extraction kit, 300 prep/kit	1 kit
5	Primer IMP-F Primer IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC (blaIMP 232 bp) GGTTTAAYAAAACAACCACC	1 set
6	Primer VIM-F Primer VIM-R	GATGGTGTGGTTCGCATA (blaVIM 390 bp) CGAATGCGCAGCACCAG	1 set
7	Primer OXA-F Primer OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC (blaOXA 438 bp) CATCAAGTTCAACCCAACCG	1 set
8	Primer KPC-Fm Primer KPC-Rm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG (blaKPC 798 bp) CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	1 set
9	Primer NDM-F Primer NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC (blaNDM 621 bp) CGGAATGGCTCATCACGATC	1 set
10	Primer UidA Bakteri <i>Escherichia coli</i>	For: GTCACGCCGTATGTTATTG (621 bp) Rev: CCAAAGCCAGTAAAGTAGAAC	1 set
11	Primer 16s DNA Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	For: ATGTCTGGGAAACTGCCTGATG (372 bp) Rev: CGGGTAACGTCAATAGACAAGG	1 set
12	Primer GyrA Bakteri <i>Klebsiella sp</i>	For: CGCGTACTATACGCCATGAACGTA (441 bp) Rev: ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	1 set
	 RpoB <i>siella</i>	For: CAACGGTGTGGTTACTGACG (108bp) Rev: TCTACGAAGTGGCCGTTTTTC	1 set
	- SS P.	PA-SS-F GGGGGATCTTCGGACCTCA (956 bp) PA-SS-R TCCTTAGAGTGCCACCCG	1 set

15	Enzim PCR	Go Taq Green MasterMix 100 rxns	3 set
16	RNAse Free water		
17	Agarosa	2120CN,100 gram	1 pc
18	Ethidium Bromida		
19	TBE 0,5		
20	Loading Dye		
21	DNA Leader / Marker (100 bp)	VC 100 BP Plus DNA Ladder,Vivantis	1 pack

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah Rumah Sakit Umum yang berlokasi di kota Makassar periode Juli 2024 – Agustus 2024

2.3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah spesimen *swab* dari wastafel di ruang IGD, ICU dan Rawat Inap terutama Bedah di Rumah Sakit Umum yang berlokasi di kota Makassar periode Juli 2024 - Agustus 2024 yang memenuhi kriteria subyek penelitian

2.4 Kriteria Subyek Penelitian

2.4.1 Kriteria Inklusi

1. Wastafel di ruang IGD, ICU dan Rawat Inap terutama Bedah
2. Semua wastafel yang berfungsi dengan baik

2.4.2 Kriteria Eksklusi

1. Wastafel yang tidak mempunyai fasilitas air mengalir
2. Wastafel yang tidak pernah digunakan
3. Wastafel yang digunakan membuang sampah



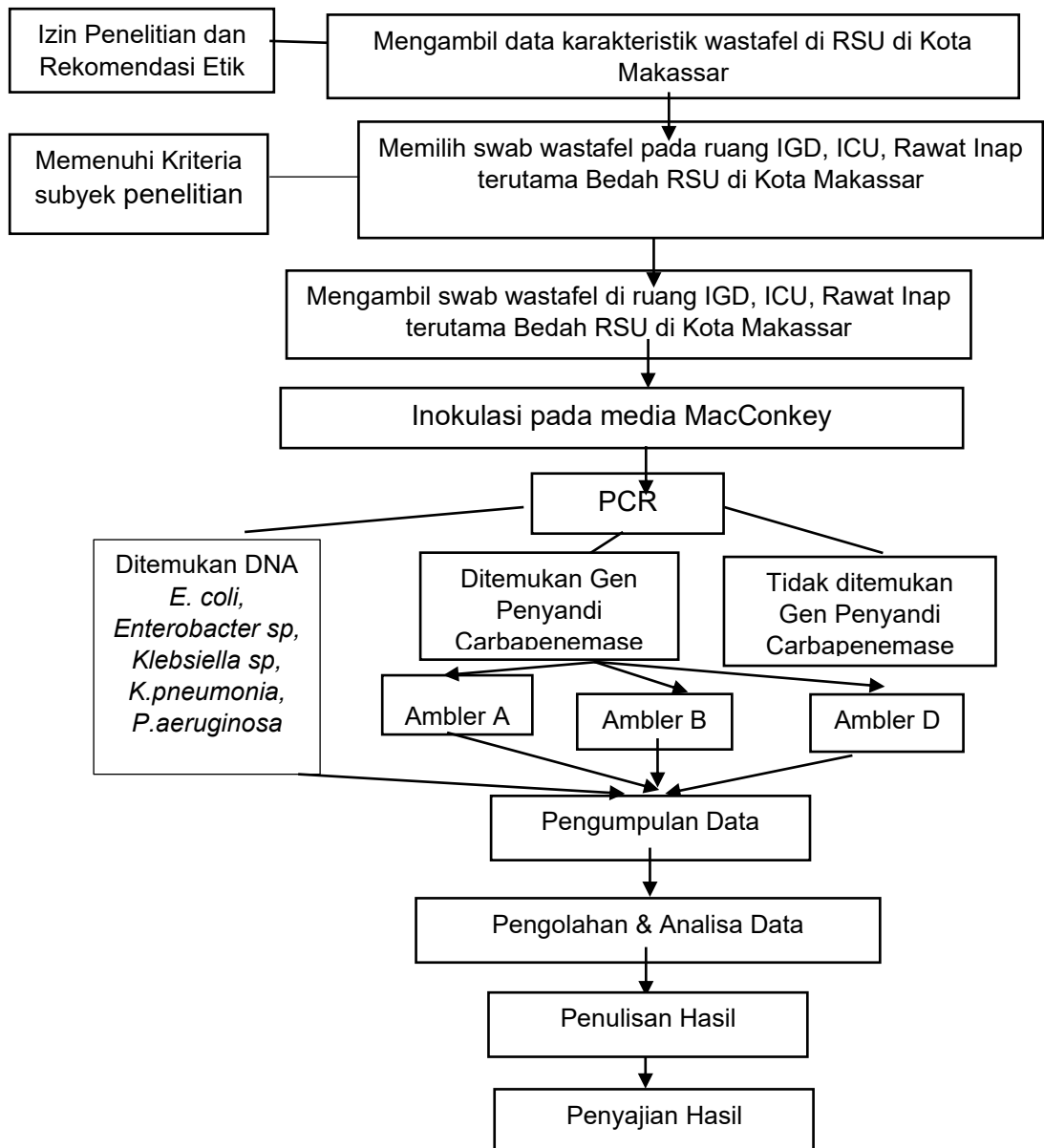
k Penelitian

$$n = N$$

(sesuai dengan jumlah wastafel yang memenuhi kriteria inklusi umum di kota Makassar)

2.6 Pelaksanaan Penelitian

2.6.1 Alur Penelitian



2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Pemeriksaan Kultur

Sampel swab wastafel diambil untuk dikultur pada media *MacConkey Agar* dengan prosedur pemeriksaan mengikuti prosedur operasional standar Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Swab Amies digunakan untuk mengumpulkan sampel dari saluran pembuangan wastafel. Swab dimasukkan ke dalam saluran pembuangan (inlet) wastafel sekitar 5-10 cm, kemudian diputar pada sisi dinding pipa wastafel, minimal 3 kali hingga setengah dari lingkaran pipa pembuangan telah diambil sampelnya. Sampel yang terkumpul dimasukkan dalam tabung dengan medium transpor Amies dan dibawa dalam kotak sampel dengan icepack ke laboratorium.

Swab wastafel diproses ≤ 24 jam setelah sampel dikumpulkan. Swab diinokulasikan pada plate agar *Macconkey* dengan streaking 4 kuadran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Keesokan harinya, plate tersebut diperiksa untuk mengetahui adanya pertumbuhan koloni bakteri fermentor laktosa atau non fermentor laktosa. Jika terdapat lebih dari 1 koloni, dilakukan subkultur ke media *MacConkey Agar*.

2.7.2 Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Setiap koloni yang tumbuh pada media *MacConkey*, dilakukan pemeriksaan PCR untuk identifikasi bakteri Negatif Gram dan identifikasi gen penyandi *carbapenemase*.

A. Melakukan Ekstraksi DNA

1. **Preparasi Sampel**
Membuat Suspensi (Bakteri Mac Farland 0,5 – 1) didalam tabung ependorf, sentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 300 x g. buang supernatant dan tambahkan 200 ul PBS, tambahkan 20 ul Proteinase K mix.
2. **Cell Lysis**
Menambahkan 200 ul GSB *Buffer vortex*, inkubasi pada suhu 60 °C selama 20 menit dimana tiap 5 menit divortex.
3. **DNA Binding**
Menambahkan 200 ul *Ethanol vortex* selama 10 detik, masukkan kedalam GS Column dalam 2 ml *collection tube* . Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 1 menit, buang cairan pada *collection tube*.
4. **Wash**
tambahkan 400 ul W1 *Buffer*, Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. buang cairan pada *collection tube*, menambahkan 600 ul *Wash Buffer*. Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. Ganti *collection tube* dengan yang baru, sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 3 menit



5. *Elution*

Memindahkan GS *Column* ke tabung ependorf steril, menambahkan 100 ul *Elution Buffer* yang sebelumnya telah dipanaskan. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik

6. Membuang GS *Column*. Cairan yang terdapat pada tabung ependorf merupakan DNA produk yang siap untuk di PCR.**B. Membuat Mix PCR**

Untuk Primer IMP,VIM,NDM,OXA,KPC

Go Taq Master Mix	: 25 ul
Primer IMP-F	: 1 ul
Primer IMP-R	: 1 ul
Primer VIM-F	: 1 ul
Primer VIM-R	: 1 ul
Primer NDM-F	: 1 ul
Primer NDM-R	: 1 ul
Primer OXA-F	: 1 ul
Primer OXA-R	: 1 ul
Primer KPC-Fm	: 1 ul
Primer KPC-Rm	: 1 ul
Nuclesa Free Water	: 5,0 ul
DNA Sampel	: 10 ul
Total	: 50 ul

Untuk Primer UidA,AtpD,16sDNA,gyrA,RpoB

Go Taq Master Mix	: 25 ul
Primer UidA -F	: 1 ul
Primer UidA -R	: 1 ul
Primer AtpD -F	: 1 ul
Primer AtpD -R	: 1 ul
Primer 16s DNA -F	: 1 ul
Primer 16s DNA -R	: 1 ul
Primer GyrA -F	: 1 ul
Primer GyrA -R	: 1 ul
Primer RpoB -Fm	: 1 ul
Primer RpoB -Rm	: 1 ul
Nuclesa Free Water	: 5,0 ul
DNA Sampel	: 10 ul
Total	: 50 ul

Untuk Primer PA – SS

Go Taq Master Mix	: 25 ul
Primer PA – SS -F	: 1 ul
Primer PA – SS -R	: 1 ul
Nuclesa Free Water	: 13,0 ul
DNA Sampel	: 10 ul
Total	: 50 ul

**an Running PCR**

1 sebanyak 1x Suhu 94 °C selama 10 menit (Pre-Denaturasi)

2 sebanyak x 30 Siklus

- Step 1 Suhu 94 °C selama 20 detik(Proses Denaturasi)
- Step 2 Suhu 52 °C selama 40 detik(Proses *Aneling*)
- Step 3 Suhu 72 °C selama 30 detik (Proses *extension*)
- Cycle 3 sebanyak 1x suhu 72 °C selama 5 menit (*Final extension*)

D. Gel Elektroforesis

1. Membuat gel

- Menimbang 2 gr agarose dan melarutkan 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 menambahkan 5µl *Ethidium Bromida*
- Larutan agarose dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga beku.

2. Pembuatan *DNA Marker*

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

3. Persiapan *Running Elektroforesis*

- Gel yang telah beku dimasukkan ke dalam elektroforesis dan direndam dalam larutan TBE 0,5x
- Sebanyak 8 µl *amplicon* hasil PCR (Kontrol Positif, Kontrol negatif, 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 menambahkan 10 ul DNA *leader* 100 bp dimasukkan kedalam sumur di dekat kontrol positif

4. Melakukan *Running Elektroforesis*

- Elektroforesis dihidupkan dan dijalankan dari muatan negatif (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. Melakukan *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. Menyimpan dan mencetak gambar



Alat Gel Doc

kan Gel Doc dengan menekan tombol ON pada bagian belakang alat

kan komputer

a software *Quantity One* dengan cara *double click* pada ikon

- Memilih Gel Doc XR dari menu *File*

Mengatur Posisi Gel

- Membuka Pintu alat Gel Doc
- Menekan tombol Epi White (On) jika diperlukan/*optional*
- Metakkan Gel pada dibagian tengah kemudian pintu alat ditutup
- Mengatur *Iris*, *zoom*, dan *focus* dengan melihat ke layar monitor pada *software Quantity One*
- Pintu alat dibuka kembali dan posisi gel diatur kembali jika diperlukan

Mengatur Image/ Gambar

- Setelah pengaturan gel selesai, Menekan tombol *Trans UV* (On). Pada kondisi ini, lampu UV akan mati secara otomatis apabila pintu dibuka kecuali tombol *Hold* ditekan
- Memilih *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*)
- Apabila gambar yang diinginkan sudah terlihat dengan baik dan jelas, Klik *Freeze*
- Untuk memberikan tulisan pada gambar, pilih *Annotate*

Menyimpan dan mencetak Gambar

- Setelah selesai di edit, kemudian gambar dapat disimpan dan kemudian klik *Print* untuk mendapatkan hasil dalam bentuk foto gel

2.8 Defenisi Operasional

1. Swab Wastafel

Swab wastafel pada penelitian ini adalah *swab* Amies dimasukkan ke dalam saluran pembuangan (inlet) wastafel sekitar 5-10 cm, kemudian diputar pada sisi dinding pipa wastafel, minimal 3 kali hingga setengah dari lingkaran pipa pembuangan telah diambil sampelnya. Swab wastafel diambil di ruang IGD, ruang ICU dan ruang rawat inap bedah di Rumah Sakit umum di Kota Makassar. Transpor ke laboratorium Mikrobiologi klinik menggunakan kotak spesimen dengan *icepack* dalam waktu paling lambat < 8 jam setelah pengambilan sampel.

2. Gen Penyandi *Carbapenemase*

Gen penyandi *carbapenemase* pada penelitian ini adalah gen Kelas A (*blaKPC*), gen Kelas B (gen penyandi *Metallo-β-lactamase*: *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP*) atau gen Kelas D (gen penyandi *oxacillinase* ; *blaOXA48*) dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction* menggunakan primer :



Optimized using
trial version
www.balesio.com

1CTAGTTCTGCTGTCTTG (*blaKPC* 798 bp) dan
 1GTCATCCTTGTTAGGCG
 TTGGCGATCTGGTTTTTC (*blaNDM* 621 bp) dan
 AATGGCTCATCACGATC
 1TAGAGTGGCTTAAYTCTC (*blaIMP* 232 bp) dan
 TAAYAAAACAACCACC
 GTGTTTGGTGCATA (*blaVIM* 390 bp) dan

VIM-R CGAATGCGCAGCACCAG

- OXA-F GCGTGGTTAAGGATGAACAC (blaOXA 438 bp) dan
OXA-R CATCAAGTTCAACCCAACCG

Kriteria obyektif gen penyandi *carbapenemase*:

a) **Ditemukan gen penyandi carbapenemase:**

bila pada pemeriksaan PCR ditemukan gen bla KPC dinyatakan gen KPC positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 798 bp,
Dinyatakan gen blaNDM positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 621 bp,

Dinyatakan gen blaVIM positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 390 bp,

Dinyatakan gen blaIMP positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 232 bp,

Dinyatakan gen blaOXA 48 positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 438 bp.

b) **Tidak ditemukan gen penyandi carbapenemase:**

bila pada pemeriksaan PCR tidak ditemukan satupun dari gen blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP dan blaOXA48.

3. Bakteri Negatif Gram

Bakteri Negatif Gram pada penelitian ini yaitu *Enterobacteriaceae species* yaitu *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Enterobacter sp.*, serta *Pseudomonas aeruginosa* yang teridentifikasi dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dari swab wastafel di ruang IGD, ICU, Rawat Inap terutama Rawat Inap Bedah di Rumah Sakit Umum Kota Makassar.

Kriteria obyektif Bakteri Negatif Gram :

1. Ditemukan *Escherichia coli* bila pada hasil PCR menggunakan primer gen UidA
For: GTCACGCCGTATGTTATTG dan Rev: CCAAAGCCAGTAAAGTAGAAC
positif yaitu pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 530 bp
2. Ditemukan *Enterobacter sp* bila pada hasil PCR menggunakan primer gen 16sDNA
For: ATGTCTGGGAAACTGCCTGATG dan Rev:
CGGGTAACGTCAATAGACAAGGmpositif yaitu pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 372 bp
3. Ditemukan *Klebsiella sp* bila pada hasil PCR menggunakan primer gen GyrA For:
For: CGCGTACTATACGCCATGAACGTA dan Rev:
ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG positif yaitu pita DNA hasil amplifikasi PCR yang
ktroforesis diperkirakan 441 bp
iella pneumoniae bila pada hasil PCR menggunakan primer gen
GGTGTGGTTACTGACG dan Rev:
GCCGTTTC positif yaitu pita DNA hasil amplifikasi PCR yang
ktroforesis diperkirakan 108 bp
tomonas aeruginosa bila pada hasil PCR menggunakan primer
GGGGGATCTTCGGACCTCA dan Rev:



TCCTTAGAGTGCCCAACCG positif yaitu pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 956 bp

2.9 Pengumpulan Data

Sampel wastafel dikumpulkan dari semua rumah sakit umum di kota Makassar dari bulan Juli 2024 hingga Agustus 2024. Staf yang memiliki pengetahuan tentang indikator data karakteristik di rumah sakit diwawancarai dari setiap fasilitas. Selain itu, foto-foto diambil dari wastafel yang menjadi sampel.

2.10 Pengambilan Sampel Wastafel

Sembilan belas (19) dari 25 rumah sakit dalam penelitian ini memiliki setidaknya tiga wastafel, wastafel diambil sampelnya dari semua fasilitas yang memiliki setidaknya tiga wastafel yang terdiri dari satu wastafel di ruang gawat darurat, satu wastafel di unit perawatan intensif, dan satu wastafel di ruang rawat inap. Flocked Eswab (COPAN Diagnostics, Murrieta, CA) digunakan untuk mengumpulkan sampel dari saluran pembuangan wastafel. *Swab* Amies dimasukkan ke dalam saluran pembuangan (inlet) wastafel sekitar 5-10 cm, diputar pada sisi dinding pipa wastafel, minimal 3 kali hingga setengah dari lingkaran pipa pembuangan hingga sampel terambil. *Swab* wastafel diambil di ruang IGD, ICU dan RI terutama RI bedah di Rumah Sakit umum di Kota Makassar. Transpor ke laboratorium Mikrobiologi klinik menggunakan kotak spesimen dengan *icepack* dalam waktu paling lambat < 8 jam sejak pengambilan sampel.

2.11 Analisis Data

Analisis deskriptif digunakan untuk mengkarakterisasi karakteristik wastafel di rumah sakit dalam penelitian ini. Analisis statistik menggunakan microsoft excel.

2.12 Aspek Etika Penelitian

Tidak akan terjadi masalah etis pada penelitian ini karena:

1. Semua rujukan yang digunakan pada naskah ini diberi sitasi penulis atau editor dari jurnal atau buku yang dirujuk.
2. Penelitian ini mendapat izin dari Kepala Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu Provinsi Sulawesi Selatan
3. Penelitian ini mendapat izin dari semua direktur rumah sakit yang bersangkutan.

