

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Hasil kultur sampel urine pada media *MacConkey Agar*

Hasil identifikasi kultur di media *MacConkey Agar* dari sampel urine pasien ISK disajikan dalam tabel 2 dibawah ini:

Tabel 1 Hasil rekapitulasi identifikasi kultur bakteri

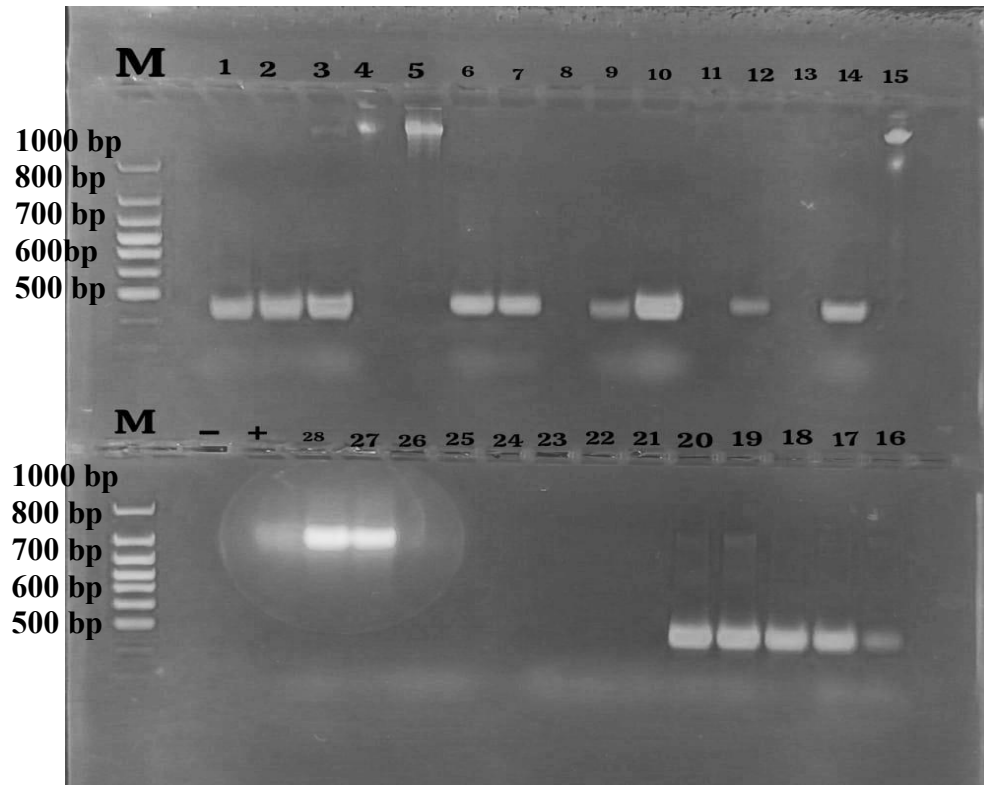
No	Hasil Identifikasi Isolat	Jumlah	Persentase	Keterangan
1	Positif	28	80%	Dilanjut PCR
2	Negatif	7	20%	Tidak dilanjutkan
Total		35	100%	

Berdasarkan Tabel diatas dari 35 sampel urin pasien ISK yang diperiksa, sebanyak 28 sampel menunjukkan pertumbuhan positif pada media *MacConkey Agar* (MCA) dengan karakteristik koloni berwarna merah muda, bulat, dan cembung, sedangkan 7 sampel tidak menunjukkan pertumbuhan sehingga tidak dilanjutkan ke tahap PCR. Pada media MCA mengindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan *Enterobacteriaceae* fermentatif laktosa, yang paling umum adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*.

2. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA yang memenuhi syarat sebagai template

PCR

Hasil elektroforesis ekstraksi DNA yang disajikan pada gambar 3 dibawah ini:

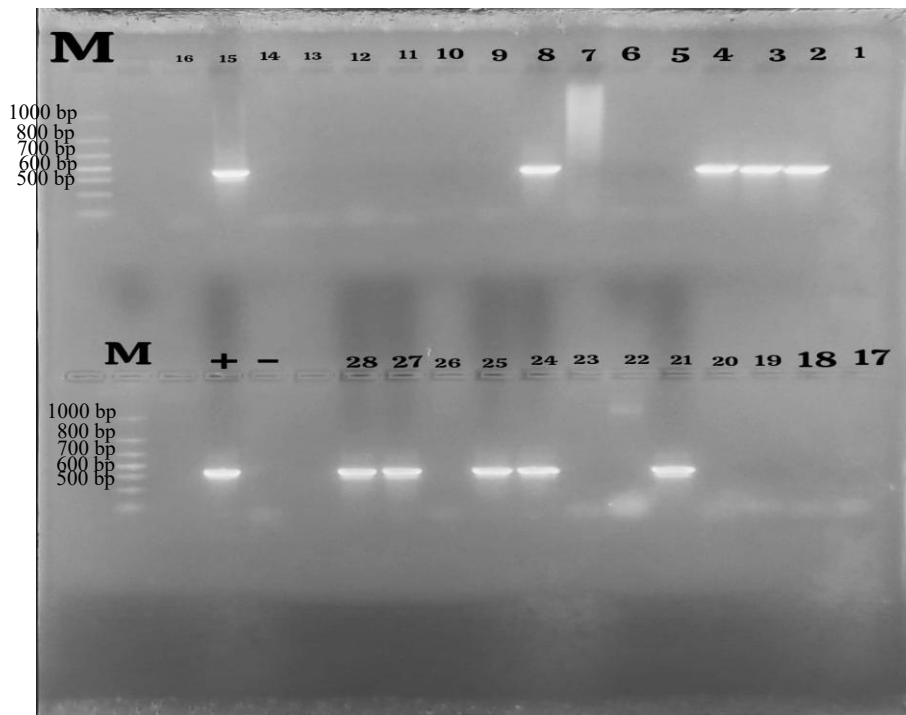


Gambar 1 Hasil elektroforesis ekstraksi DNA

Berdasarkan hasil elektroforesis ekstraksi DNA yang ditampilkan pada Gambar 3 di atas, terlihat bahwa DNA hasil ekstraksi dari berbagai isolat menunjukkan intensitas pita yang bervariasi. Sebagian besar isolat menunjukkan pita DNA yang berpendar jelas, yang mengindikasikan bahwa proses ekstraksi DNA menggunakan metode PCIA (*Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol*) berhasil dilakukan dengan baik.

3. Deteksi Gen *Bla CTX-M* metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil elektroforesis deteksi Gen *Bla CTX-M* menggunakan metode PCR yang disajikan pada gambar 4 dibawah ini:



Gambar 4 Hasil elektroforesis PCR

Berdasarkan hasil elektroforesis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada gambar di atas didapatkan Hasil amplifikasi DNA gen *Bla CTX-M* menggunakan PCR berhasil divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarose 1.5% dan UV-Transluminator terlihat adanya pita DNA yang berpendar pada sumur 2, 3, 4, 8, 15, 21, 24, 25, 27, dan 28 sehingga dapat dikatakan produk PCR berhasil di amplifikasi secara spesifik dan ukuran fragmen pita DNA sesuai dengan target yaitu 560-593 bp. Dan terdapat 18 hasil negatif pada sumur 1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, dan 26 yang dimana tidak adanya pendaran pita DNA yang artinya bakteri dalam sampel tersebut tidak membawa gen target. Adapun pada kontrol negatif tidak terdapat pendaran pita DNA yang menunjukkan tidak

adannya bakteri pada hasil ekstraksi serta tidak ada kontaminasi silang yang menyebabkan hasil positif palsu.

4. Hasil sebaran Gen *Bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari pasien ISK

Hasil sebaran Gen *Bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae* disajikan dalam tabel 3 dibawah ini:

Tabel 2 Hasil rekapitulasi sebaran Gen *Bla CTX-M*

No	Hasil	Jumlah	Persentase
1	Positif	10	35,7 %
2	Negatif	18	64,3 %
	Total	28	100 %

Berdasarkan Tabel di atas, dari total 28 isolat *Enterobacteriaceae* yang berhasil diidentifikasi dan dilanjutkan ke tahap deteksi molekuler, sebanyak 10 isolat (35,7%) menunjukkan hasil positif mengandung gen *Bla CTX-M*, sedangkan 18 isolat lainnya (64,3%) menunjukkan hasil negatif atau tidak terdeteksi adanya gen *Bla CTX-M*. Hasil positif ditandai dengan munculnya pita DNA pada ukuran 560–593 bp setelah visualisasi elektroforesis gel agarosa, sesuai dengan target amplifikasi primer yang digunakan. Dengan demikian, sebaran gen *Bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urin pasien ISK di RSUD Wangaya Denpasar adalah sebesar 35,7%.

A. Pembahasan

1. Identifikasi isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urin pasien ISK.

Identifikasi isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urine pasien ISK dilakukan dengan mengkultur sampel urine pada media *MacConkey Agar*. Media ini bersifat selektif karena mengandung garam empedu dan kristal violet yang menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, sehingga hanya bakteri Gram negatif yang dapat tumbuh (Sari & Muhartono, 2018). Selain itu, media *MacConkey Agar* juga bersifat diferensial karena mengandung laktosa dan indikator phenol red, bakteri yang memfermentasi laktosa akan membentuk koloni berwarna merah muda, sedangkan yang tidak memfermentasi laktosa membentuk koloni tidak berwarna (Kholisha *et al.*, 2023).

Pemilihan media *MacConkey Agar* dalam penelitian ini didasarkan pada beberapa alasan. Pertama, MCA bersifat selektif terhadap Gram negatif karena mengandung garam empedu dan kristal violet, sehingga hanya *Escherichia coli* yang dapat tumbuh (Sari & Muhartono, 2018). Kedua, hampir 90–95% kasus ISK disebabkan oleh *Escherichia coli*, menjadikan MCA sebagai media skrining awal yang tepat (Megawati *et al.*, 2023). Ketiga, penggunaan MCA sejalan dengan penelitian terdahulu, seperti Prasetya (2017) yang mengisolasi bakteri dari sampel urin menggunakan MCA sebelum dilanjutkan ke uji molekuler, serta Rahman *et al.* (2010) yang juga menggunakan MCA untuk isolasi awal *Enterobacteriaceae* sebelum deteksi gen *bla CTX-M* dengan PCR. Dengan demikian, 28 isolat yang tumbuh pada MCA memenuhi kriteria inklusi dan layak dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA dan deteksi gen *bla CTX-M* (Megawati *et al.*, 2023).

Penggunaan media *MacConkey Agar* sebagai media isolasi awal dari sampel urine pasien ISK juga telah banyak dilaporkan dalam penelitian di Indonesia. Penelitian oleh Yulianto (2017) menggunakan media MCA untuk mengisolasi bakteri *Enterobacteriaceae* dari sampel urine pasien ISK sebelum dilakukan deteksi gen, termasuk *bla CTX-M*, secara molekuler. Selain itu, penelitian oleh Prasetya (2017) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya juga menggunakan media MCA untuk isolasi *Escherichia coli* dari urine pasien ISK sebelum dilakukan deteksi gen *bla CTX-M* menggunakan metode PCR.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa media MCA efektif digunakan sebagai tahap awal dalam menyeleksi bakteri Gram negatif, khususnya *Escherichia coli* yang berperan sebagai penyebab utama ISK. Hal ini didasarkan bahwa hampir 90-95% kasus ISK disebabkan oleh bakteri dari famili *Escherichia coli*, terutama *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Proteus spp.* (Megawati *et al.*, 2023; Yashir & Apriani, 2019).

Pertumbuhan koloni pada media *MacConkey Agar* secara kuat mengindikasikan adanya bakteri *Escherichia coli* dalam sampel urine pasien. Penelitian oleh Irma *et al.* (2024) juga menegaskan bahwa *Escherichia coli* merupakan kelompok utama agen penyebab ISK di fasilitas kesehatan. Dari 35 sampel urine yang diperiksa, 28 sampel (80%) menunjukkan pertumbuhan koloni merah muda pada MCA. Angka ini sejalan dengan berbagai penelitian yang melaporkan bahwa *Escherichia coli*, terutama *E. coli* dan *K. pneumoniae*, bertanggung jawab atas 70-95% kasus ISK (Megawati *et al.*, 2023; Yashir & Apriani, 2019). Koloni merah muda yang dominan dalam penelitian ini mengindikasikan bahwa sebagian besar isolat merupakan *Escherichia coli* fermentatif laktosa. Hal ini penting karena *E. coli* dan *K.*

pneumoniae adalah dua kelompok bakteri yang paling sering ditemukan dalam konteks klinis, terutama pada kasus ISK nosokomial (Sugianli *et al.*, 2020).

Tingginya angka pertumbuhan positif (80%) juga mencerminkan bahwa kriteria inklusi pasien dengan diagnosis klinis ISK yang disertai urinalisis positif (leukosit esterase dan/atau nitrit) telah tepat sasaran. Leukosit esterase menandakan adanya respons inflamasi akibat infeksi, sementara nitrit positif mengindikasikan adanya bakteri pereduksi nitrat, yang umumnya adalah *Escherichia coli* (Kholisha *et al.*, 2023). Dengan demikian, pendekatan bertingkat dari skrining klinis, urinalisis, hingga kultur pada MCA terbukti efektif untuk mengidentifikasi isolat *Escherichia coli* yang layak untuk deteksi molekuler lebih lanjut. Dalam penelitian ini, koloni yang tumbuh pada *MacConkey Agar* langsung dikategorikan sebagai isolat *Escherichia coli*, karena tujuan akhirnya adalah deteksi gen resistensi *bla CTX-M* secara molekuler, bukan identifikasi spesies bakteri secara rinci.

Data rekam medis RSUD Wangaya yang menunjukkan peningkatan kasus ISK dari 211 (2024) menjadi 234 (2025) pasien rawat inap mengindikasikan tingginya beban infeksi, sehingga deteksi dini gen resistensi menjadi sangat penting (Maharani *et al.*, 2021)

2. Mendapatkan hasil ekstraksi DNA yang memenuhi syarat sebagai template PCR

Ekstraksi DNA merupakan tahap krusial karena keberhasilan amplifikasi sangat bergantung pada kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan (Garibyan *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA dilakukan dari koloni murni bakteri yang tumbuh pada media *MacConkey Agar* menggunakan metode PCIA (*Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol*). Metode PCIA merupakan teknik ekstraksi DNA

tradisional yang paling umum digunakan di laboratorium klinis. Prinsip kerja metode PCIA adalah pencampuran larutan *phenol-chloroform* dengan sampel bakteri, diikuti dengan sentrifugasi untuk memisahkan fase organik (mengandung protein dan lipid) dari fase air (mengandung DNA). Fenol berfungsi untuk mendenaturasi protein, sementara kloroform membantu menghilangkan sisa fenol dan lipid (Setiawan *et al.*, 2021).

Keberhasilan ekstraksi DNA dalam penelitian ini dinilai dari kemampuannya untuk diamplifikasi oleh PCR, yang dibuktikan dengan munculnya pita DNA pada hasil elektroforesis untuk sampel positif. DNA yang layak sebagai template harus bebas dari inhibitor PCR seperti protein, fenol, atau garam yang dapat mengganggu aktivitas enzim DNA polimerase (Setiawan *et al.*, 2021). Sisa phenol atau chloroform yang terbawa saat elusi dapat menghambat reaksi PCR, sehingga proses washing dan air drying harus dilakukan secara optimal (Nugroho *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, tidak adanya pita DNA pada kontrol negatif menegaskan bahwa proses ekstraksi berlangsung steril dan tidak terjadi kontaminasi silang. Sebagaimana dijelaskan oleh Yulianto (2017), kontrol negatif yang bersih merupakan indikator penting bahwa reagen yang digunakan bebas dari kontaminan DNA.

Dengan demikian, DNA hasil ekstraksi metode PCIA dalam penelitian ini memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap amplifikasi PCR. Hasil elektroforesis DNA total menunjukkan pita DNA pada seluruh 28 isolat, dengan intensitas yang bervariasi. Pita DNA yang terang dan tebal mengindikasikan bahwa proses ekstraksi berhasil menghasilkan DNA dalam jumlah banyak dengan integritas yang tinggi. Hal ini dapat terjadi jika jumlah sel bakteri awal cukup, proses lisis sel

berlangsung sempurna, dan tahap pencucian (*washing*) tidak menyebabkan kehilangan DNA yang signifikan. Sebaliknya, pita DNA yang tipis menunjukkan jumlah DNA yang terekstraksi relatif lebih sedikit, yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti jumlah koloni bakteri yang diambil untuk ekstraksi tidak seragam, efisiensi lisis sel yang bervariasi antar isolat karena perbedaan ketebalan dinding, dan adanya kehilangan DNA selama tahap pencucian dengan etanol (Nugroho *et al.*, 2022).

Meskipun demikian, pita DNA tipis yang masih terlihat pada posisi yang sesuai dengan DNA genom tetap menunjukkan bahwa ekstraksi DNA berhasil dilakukan. Hal ini penting karena metode PCR memiliki sensitivitas yang sangat tinggi; DNA dalam jumlah nanogram sekalipun masih dapat diamplifikasi (Garibyan *et al.*, 2013).

Tidak adanya pita DNA pada kontrol negatif merupakan indikator penting bahwa proses ekstraksi berlangsung steril dan tidak terjadi kontaminasi silang antar sampel. Sebagaimana dijelaskan oleh Yulianto (2017), kontrol negatif yang bersih menunjukkan bahwa reagen yang digunakan (seperti buffer, fenol, kloroform, dan etanol) bebas dari kontaminan DNA, sehingga hasil positif yang muncul pada sampel uji dapat diyakini berasal dari DNA bakteri target, bukan dari kontaminasi. Dengan demikian, DNA hasil ekstraksi metode PCIA dalam penelitian ini memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap amplifikasi PCR.

3. Menganalisis hasil identifikasi bakteri dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk menentukan Gen *Bla CTX-M*

Deteksi gen *bla CTX-M* dalam penelitian ini menggunakan metode PCR, yang merupakan teknik amplifikasi DNA in vitro dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam mendeteksi gen resistensi, bahkan pada jumlah DNA yang sangat kecil (Garibyan *et al.*, 2013). Primer yang digunakan adalah primer spesifik untuk gen *bla CTX-M* dengan sekuen forward 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3' dan reverse 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3', yang menghasilkan produk amplifikasi berukuran sekitar 560–593 bp (Rahman *et al.*, 2010; Kurniawan *et al.*, 2023).

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa 10 sampel berhasil diamplifikasi dan menghasilkan pita DNA pada ukuran target, yang mengonfirmasi bahwa isolat tersebut secara genetik membawa gen *bla CTX-M*. Hal ini sesuai dengan temuan Prasetya (2017) bahwa gen *bla CTX-M* merupakan salah satu gen paling dominan pada isolat klinis di Indonesia. Gen *bla CTX-M* memiliki kemampuan superior dalam menghidrolisis sefotaksim dibandingkan dengan sefalosporin lainnya, dan penyebarannya difasilitasi oleh plasmid yang memungkinkan transfer horizontal antar bakteri (Rahman *et al.*, 2010; Yulianto, 2017).

Namun, ditemukan pula 18 sampel yang tidak menunjukkan pita DNA, yang mengindikasikan bahwa meskipun isolat tersebut tumbuh pada media *MacConkey Agar*, mereka tidak membawa gen *bla CTX-M*. Kemungkinan lain, resistensi terhadap antibiotik β -laktam pada isolat tersebut disandi oleh gen tipe lain seperti *bla TEM* atau *bla SHV* (Yulianto, 2017; Rezky, 2023). Hal ini penting karena menunjukkan bahwa deteksi molekuler tidak boleh hanya terfokus pada satu

gen saja untuk mendapatkan gambaran resistensi yang komprehensif (Sugianli *et al.*, 2020). Optimasi kondisi PCR seperti suhu annealing dan konsentrasi MgCl₂ juga berperan penting dalam keberhasilan amplifikasi, dan dalam penelitian ini kondisi tersebut telah dioptimalkan sehingga pita DNA yang muncul tampak jelas tanpa smear atau pita non-spesifik (Handoyo & Rudiretna, 2017).

4. Menganalisis sebaran Gen *Bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari pasien ISK

Berdasarkan hasil penelitian, dari total isolat *Enterobacteriaceae* yang diuji, ditemukan 10 sampel positif (35,7%) membawa gen *bla CTX-M*. sebaran ini memberikan gambaran bahwa gen *bla CTX-M* telah menyebar di antara isolat bakteri yang diisolasi dari pasien ISK di RSUD Wangaya Denpasar.

Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, sebaran gen *bla CTX-M* bervariasi antar wilayah. Penelitian oleh Prasetya (2017) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya melaporkan bahwa 90% isolat *Enterobacteriaceae* mengandung gen *bla CTX-M*. Sementara itu, penelitian oleh Rahman *et al.* (2010) di Bangladesh melaporkan sebaran gen *bla CTX-M* sebesar 66,5%. Variasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain perbedaan kebijakan penggunaan antibiotik di masing-masing rumah sakit, tingkat kepatuhan terhadap pengendalian infeksi, serta perbedaan karakteristik populasi pasien (Yulianto, 2017; Sugianli *et al.*, 2020). Data rekam medis RSUD Wangaya yang menunjukkan peningkatan kasus ISK dari tahun 2024 ke 2025 (dari 211 menjadi 234 pasien rawat inap) mengindikasikan bahwa beban infeksi cukup tinggi, yang berpotensi meningkatkan tekanan seleksi terhadap bakteri resisten (Maharani *et al.*, 2021).

Sebaran gen *bla CTX-M* yang terdeteksi dalam penelitian ini menjadi dasar penting bagi pengembangan kebijakan terapi antibiotik yang lebih rasional. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 2023) telah mengklasifikasikan resistensi antibiotik sebagai ancaman serius, dan deteksi gen resistensi seperti *bla CTX-M* merupakan langkah awal dalam surveilans molekuler. Dengan mengetahui sebaran gen ini, tenaga kesehatan dapat mempertimbangkan penggunaan antibiotik alternatif seperti karbapenem atau antibiotik non- β -laktam untuk kasus ISK yang diduga disebabkan oleh bakteri penghasil *Extended Spectrum β -lactamase*, meskipun penggunaannya harus tetap dikontrol untuk mencegah resistensi lebih lanjut (Adamus *et al.*, 2018; Sugianli *et al.*, 2020).

Hasil deteksi gen *Bla CTX-M* pada 10 isolat (35,7%) menunjukkan bahwa gen resistensi ini telah menyebar pada isolat Enterobacteriaceae dari pasien infeksi saluran kemih. Gen *Bla CTX-M* merupakan salah satu gen pengkode enzim *Beta-Lactamase* yang memiliki kemampuan menghidrolisis antibiotik golongan β -laktam, terutama sefalosporin generasi ketiga seperti sefotaksim (Prasetya, 2017; Yulianto, 2017). Menurut Rahman *et al.* (2010), enzim yang disandi oleh gen *bla CTX-M* bekerja dengan cara memecah cincin β -laktam pada antibiotik, sehingga antibiotik kehilangan aktivitas bakterisidanya. Penyebaran gen *Bla CTX-M* difasilitasi oleh plasmid yang memungkinkan transfer materi genetik secara horizontal antar bakteri, baik antar spesies maupun genus dalam famili Enterobacteriaceae (Rahman *et al.*, 2010; Prasetya, 2017). Penggunaan antibiotik β -laktam secara luas menciptakan tekanan seleksi terhadap bakteri Enterobacteriaceae. Bakteri yang membawa gen *bla CTX-M* akan bertahan hidup

sementara bakteri sensitif mati, sehingga populasi bakteri resisten semakin dominan (Adamus *et al.*, 2018).

Penelitian ini telah berhasil mengidentifikasi secara molekuler gen *bla CTX-M*, namun penelitian ini belum melakukan identifikasi pada tingkat spesies. Adapun beberapa keterbatasan dalam penelitian ini yaitu Pertama, identifikasi bakteri hanya berdasarkan pertumbuhan pada media *MacConkey Agar* tanpa konfirmasi biokimia atau molekuler lebih lanjut, sehingga tidak diketahui secara pasti spesies bakteri penyusun isolat. Kedua, uji fenotipik seperti DDST tidak dilakukan, sehingga tidak semua isolat yang diuji diketahui statusnya secara fenotipik. Ketiga, deteksi gen hanya terfokus pada gen *bla CTX-M* tanpa meneliti gen lain seperti *bla TEM* dan *bla SHV*, sehingga hasil negatif tidak serta-merta berarti isolat tersebut tidak resisten terhadap antibiotik β -laktam.