

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Hasil identifikasi isolat *Enterobacteriaceae*

Hasil identifikasi isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urine pasien ISK disajikan dalam tabel di bawah ini.

Table 2 Hasil identifikasi isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dari sampel urin pasien ISK

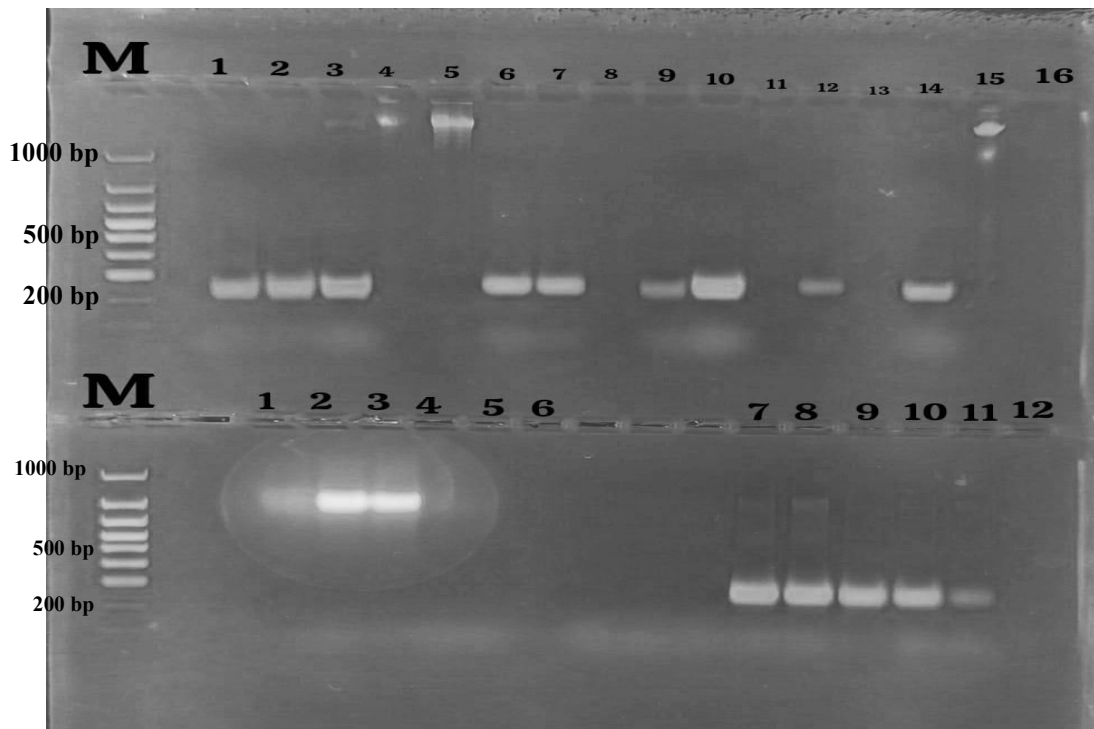
No	Hasil identifikasi isolat <i>Enterobacteriaceae</i>	Jumlah	Persentase	Keterangan
1.	Positif	28 sampel	80%	Dilanjutkan PCR
2.	Negatif	7 sampel	20%	Tidak dilanjutkan
Total		35 sampel	100%	

Berdasarkan Tabel 1, dari 35 sampel urine pasien ISK yang diperiksa, sebanyak 28 sampel (80%) menunjukkan pertumbuhan positif pada media *MacConkey Agar* (MCA) dengan karakteristik koloni berwarna merah muda, bulat, dan cembung, sedangkan 7 sampel (20%) tidak menunjukkan pertumbuhan sehingga tidak dilanjutkan ke tahap PCR.

Dengan demikian, 28 isolat yang tumbuh pada MCA memenuhi kriteria inklusi dan dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA dan deteksi gen *blaTEM*.

2. Hasil ekstraksi DNA dari isolat *Enterobacteriaceae*

Hasil elektroforesis ekstraksi DNA dari isolat *Enterobacteriaceae* disajikan pada Gambar 3 di bawah ini.

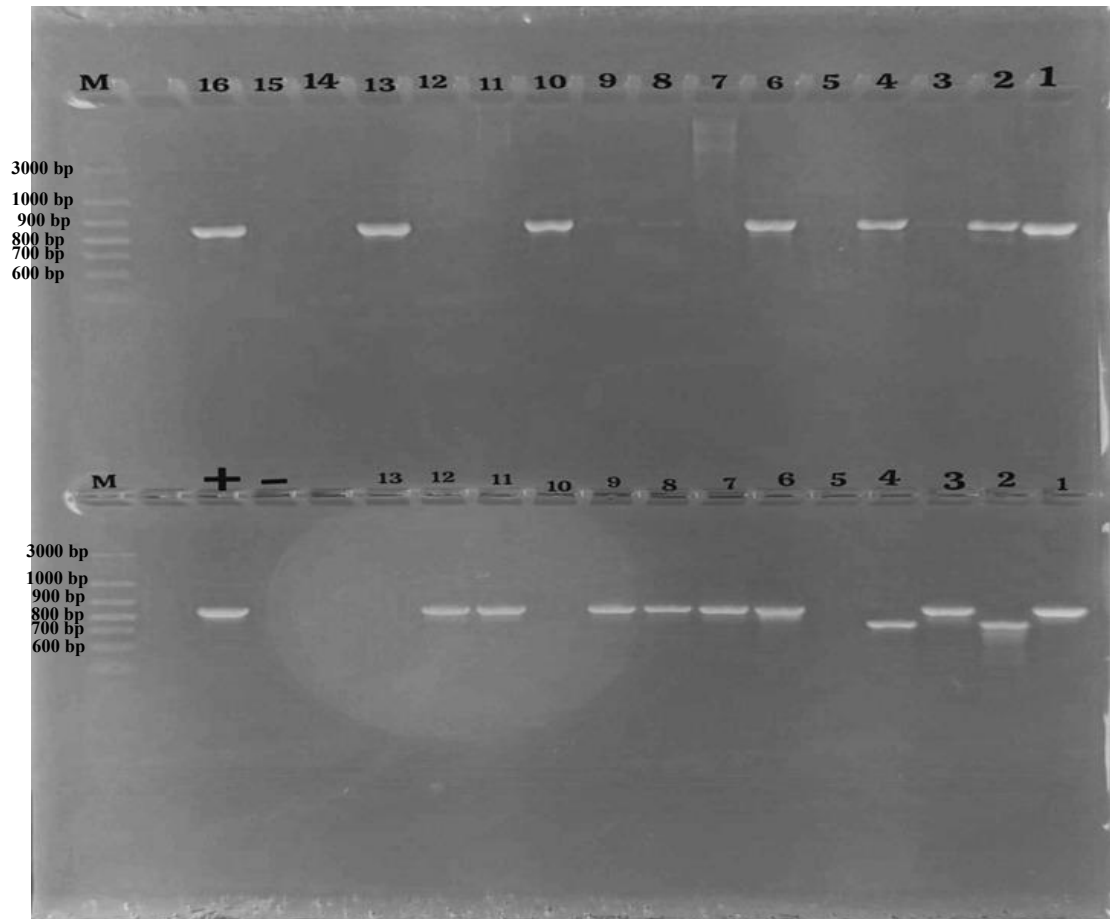


Gambar 3 Hasil elektroforesis ekstraksi DNA dari isolat *Enterobacteriaceae*

Berdasarkan hasil elektroforesis ekstraksi DNA yang ditampilkan pada Gambar 3, 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 berhasil dengan baik. Visualisasi ukuran DNA dalam penelitian ini menggunakan DNA leader dengan ukuran 100 bp (rentang 100–3000 bp) sebagai penanda fragmentasi. Dengan demikian, seluruh sampel yang menunjukkan pita DNA (baik dengan intensitas jelas maupun tipis) pada elektroforesis hasil ekstraksi ini memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap amplifikasi PCR guna mendeteksi gen *blaTEM*.

3. Deteksi gen *blaTEM* metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Visualisasi hasil amplifikasi gen *blaTEM* menggunakan PCR dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4 Hasil elektroforesis Deteksi gen *blaTEM*
metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil amplifikasi DNA gen *blaTEM* menggunakan metode PCR berhasil divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 1,5% dan diamati menggunakan *UV-transilluminator*. Berdasarkan hasil tersebut, terlihat adanya pita DNA pada sebagian besar sampel yang menunjukkan keberhasilan amplifikasi gen target secara spesifik dengan ukuran fragmen yang sesuai, yaitu sekitar ± 850 bp.

Sampel yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya pita DNA, yaitu sebanyak 17 sampel. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri pada sampel tersebut mengandung gen *blaTEM*.

Sementara itu, pada kontrol negatif (-) tidak ditemukan adanya pita DNA, yang menandakan tidak terjadi kontaminasi selama proses ekstraksi maupun amplifikasi. Sebaliknya, kontrol positif (+) menunjukkan adanya pita DNA yang jelas pada ukuran target, sehingga dapat dipastikan bahwa proses PCR berjalan dengan baik dan hasil yang diperoleh valid.

4. Hasil sebaran gen *blaTEM* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari pasien ISK

Distribusi gen *blaTEM* pada isolat *Enterobacteriaceae* yang terdeteksi dirangkum dalam Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3 Hasil sebaran gen *blaTEM* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari pasien ISK

No	Hasil	Jumlah	Persentase
1	Positif	17	60, 7 %
2	Negatif	11	39,3 %
Total		28	100%

Berdasarkan Tabel diatas, dari total 28 isolat *Enterobacteriaceae* yang diuji, sebanyak 17 isolat (60,7%) terdeteksi positif membawa gen *blaTEM* yang ditandai dengan munculnya pita DNA pada ukuran ± 850 bp, sedangkan 11 isolat lainnya (39,3%) menunjukkan hasil negatif. Kontrol negatif tidak menunjukkan pita DNA, menandakan tidak adanya kontaminasi selama proses ekstraksi dan amplifikasi, sedangkan kontrol positif menunjukkan pita yang jelas pada ukuran target, memvalidasi bahwa proses PCR berjalan dengan baik.

Dengan demikian, prevalensi gen *blaTEM* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urin pasien ISK di RSUD Wangaya Denpasar adalah sebesar 60,7%.

B. Pembahasan

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

Identifikasi awal bakteri dalam penelitian ini dilakukan melalui kultur sampel urin menggunakan media *MacConkey Agar* (MCA). Media ini digunakan karena mampu mendukung pertumbuhan bakteri Gram negatif sekaligus membantu membedakan karakteristik bakteri berdasarkan kemampuan fermentasi laktosa.

Pemilihan media MCA didasarkan pada perannya sebagai media selektif dan diferensial yang umum digunakan dalam isolasi bakteri penyebab infeksi saluran kemih. Secara teori, ISK dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme, baik bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Namun, bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* merupakan penyebab yang sering ditemukan, terutama *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, dan *Enterobacter sp.* Selain itu, bakteri lain seperti *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus saprophyticus* juga dapat menjadi penyebab ISK, meskipun dengan frekuensi yang lebih rendah. Hal ini sesuai dengan laporan bahwa *Enterobacteriaceae* merupakan kelompok bakteri yang paling dominan pada kasus ISK (Kandarini *et al.*, 2020).

Karakteristik koloni berwarna merah muda yang ditemukan pada 28 isolat (80%) mengindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan *Enterobacteriaceae* fermentatif laktosa, yang paling umum adalah *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. Kedua bakteri ini dikenal sebagai penyebab utama ISK, bertanggung jawab atas 70-80% kasus ISK baik di komunitas maupun di fasilitas kesehatan

(Megawati *et al.*, 2023; Yashir & Apriani, 2019). Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan di Bali oleh Ananda *et al.* (2024) yang melaporkan bahwa *E. coli* merupakan penyebab ISK terbanyak (29,2%), diikuti oleh *K. pneumoniae* (20,8%). Tingginya angka pertumbuhan positif (80%) dalam penelitian ini juga mencerminkan bahwa kriteria inklusi pasien dengan diagnosis klinis ISK yang didukung pemeriksaan urinalisis (leukosit esterase positif dan/atau nitrit positif) telah tepat sasaran. Leukosit esterase menandakan adanya respons inflamasi akibat infeksi, sementara nitrit positif mengindikasikan adanya bakteri pereduksi nitrat, yang umumnya adalah *Enterobacteriaceae* (Kholisha *et al.*, 2023).

Dalam penelitian ini, koloni yang tumbuh pada media MCA tidak dilanjutkan dengan identifikasi fenotipik lanjutan seperti pewarnaan Gram dan uji biokimia (IMViC, TSI, urease), melainkan langsung digunakan untuk proses ekstraksi DNA. Pendekatan ini dilakukan karena penelitian berfokus pada deteksi gen *blaTEM* secara molekuler menggunakan metode PCR. Metode PCR dinilai lebih spesifik karena mendeteksi keberadaan gen resistensi secara langsung pada tingkat DNA, berbeda dengan metode konvensional yang hanya mengidentifikasi bakteri berdasarkan sifat fenotipik dan tidak dapat mengonfirmasi keberadaan gen resistensi secara spesifik (Widyawati *et al.*, 2024).

Dengan demikian, penggunaan media MCA dalam penelitian ini berperan sebagai tahap awal dalam memperoleh isolat bakteri yang kemudian dianalisis lebih lanjut secara molekuler untuk mengetahui keberadaan gen *blaTEM*.

2. Ekstraksi DNA Isolat Bakteri Menggunakan Metode PCIA

Salah satu tahapan penting dalam pemeriksaan molekuler adalah proses ekstraksi DNA. Pada penelitian ini, ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol* (PCIA). Metode ini bekerja dengan memisahkan DNA dari protein dan komponen sel lainnya melalui proses denaturasi dan pemisahan fase. Penggunaan metode PCIA dikenal mampu menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang tinggi, karena metode PCIA bekerja dengan cara mencampurkan larutan fenol-kloroform dengan sampel bakteri, diikuti 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 (Green *et al.*, 2021).

Berdasarkan hasil elektroforesis DNA total, sebagian besar isolat menunjukkan pita DNA yang berpendar jelas dan tebal. Namun, terdapat pula beberapa isolat yang menunjukkan pita DNA dengan intensitas tipis. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor teknis. Pertama, jumlah koloni bakteri yang diambil untuk ekstraksi mungkin tidak seragam, sehingga jumlah DNA yang dihasilkan bervariasi. Kedua, efisiensi lisis sel dapat bervariasi antar isolat karena perbedaan ketebalan dinding sel, terutama antara *E. coli* (dinding sel tipis) dan *K. pneumoniae* (dinding sel lebih tebal dengan kapsul polisakarida). Ketiga, kemungkinan terjadinya kehilangan DNA selama tahap pencucian (*washing*) dengan etanol, di mana DNA dapat ikut terbuang jika tidak dilakukan dengan hati-hati (Nugroho *et al.*, 2022).

Meskipun demikian, pita tipis yang masih terlihat pada posisi yang sesuai dengan DNA genom tetap menandakan bahwa ekstraksi DNA berhasil dilakukan. Hal ini penting karena metode PCR memiliki sensitivitas yang sangat tinggi yang

membuat DNA dalam jumlah nanogram sekalipun masih dapat diamplifikasi (Dallenne *et al.*, 2010). Tidak adanya pita DNA pada kontrol negatif juga menegaskan bahwa proses ekstraksi berlangsung steril dan tidak terjadi kontaminasi silang antar sampel. Dengan demikian, seluruh sampel yang menunjukkan pita DNA (baik jelas maupun tipis) pada elektroforesis hasil ekstraksi ini memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap amplifikasi PCR guna mendeteksi gen *blaTEM*.

Hal ini mengindikasikan bahwa proses ekstraksi berhasil menghasilkan DNA genom dalam jumlah yang cukup dengan integritas yang tinggi. Pita yang tebal menandakan bahwa DNA tidak terdegradasi dan memiliki kemurnian yang baik, sehingga sangat layak digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi PCR (Green *et al.*, 2021).

3. Deteksi Gen *blaTEM* Menggunakan Metode PCR

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) digunakan dalam penelitian ini karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam mendeteksi gen resistensi antibiotik. Teknik ini memungkinkan amplifikasi DNA target secara eksponensial, sehingga gen dengan jumlah yang sangat kecil sekalipun dapat terdeteksi (Dallenne *et al.*, 2010). *Primer* yang digunakan merupakan primer spesifik untuk gen *blaTEM* dengan sekuen *forward* 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' dan *reverse* 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3', yang menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran sekitar ± 850 bp sesuai dengan target gen (Colom *et al.*, 2003).

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa sebagian besar sampel menghasilkan pita DNA pada kisaran ± 800 – 900 bp. Ukuran ini sesuai dengan target gen *blaTEM*,

sehingga menunjukkan bahwa gen tersebut berhasil diamplifikasi dengan baik. Munculnya pita DNA yang jelas dan berada pada posisi yang seragam mengindikasikan bahwa proses amplifikasi berlangsung secara spesifik tanpa adanya pita non-spesifik. Keberhasilan amplifikasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain kualitas DNA hasil ekstraksi, spesifisitas *primer*, serta kondisi siklus PCR yang optimal. Suhu *annealing* yang sesuai memungkinkan primer berikatan secara spesifik dengan sekuens target, sedangkan suhu ekstensi yang optimal mendukung kerja enzim *Taq DNA polymerase* dalam mensintesis DNA baru (Dallenne *et al.*, 2010).

Namun demikian, pada sampel yang tidak menunjukkan pita DNA, kemungkinan disebabkan oleh tidak adanya gen *blaTEM* dalam isolat tersebut atau adanya gen resistensi lain seperti *blaSHV* atau *blaCTX-M* yang tidak terdeteksi dalam penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa resistensi antibiotik pada bakteri dapat melibatkan berbagai jenis gen, tidak hanya satu gen tertentu (Widyawati *et al.*, 2024). Selain itu, keberadaan pita pada kontrol positif dan tidak ditemukannya pita pada kontrol negatif menunjukkan bahwa proses PCR berjalan dengan baik dan tidak terjadi kontaminasi, sehingga hasil yang diperoleh dapat dinyatakan valid.

4. Analisis Keberadaan Gen *blaTEM* pada Isolat

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dari 28 isolat *Enterobacteriaceae* yang diuji, sebanyak 17 isolat (60,7%) terdeteksi positif membawa gen *blaTEM*. Hal ini menunjukkan bahwa gen tersebut merupakan salah satu gen yang dominan dalam mekanisme resistensi antibiotik pada bakteri *Enterobacteriaceae* penyebab infeksi saluran kemih. Dari 17 isolat positif, pita DNA yang muncul umumnya berpendar jelas dan spesifik, menandakan bahwa proses amplifikasi berlangsung

optimal. Sementara itu, pada 11 isolat negatif tidak ditemukan pita DNA pada ukuran target. Hal ini dapat disebabkan oleh tidak adanya gen *blaTEM* pada isolat tersebut atau kemungkinan isolat membawa gen ESBL lain seperti *blaSHV* atau *blaCTX-M* yang tidak dapat terdeteksi oleh primer spesifik *blaTEM* dalam penelitian ini

Gen *blaTEM* menyandi enzim β -laktamase tipe TEM yang mampu merusak struktur cincin β -laktam pada antibiotik, sehingga antibiotik menjadi tidak efektif. Keberadaan gen ini menjadi indikator penting dalam menentukan pola resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu (Widyawati *et al.*, 2024).

Tingginya penyebaran gen *blaTEM* pada penelitian ini juga dapat dikaitkan dengan penggunaan antibiotik yang luas dan tidak rasional. Paparan antibiotik yang berulang dapat menyebabkan seleksi bakteri yang memiliki gen resistensi, sehingga gen tersebut menjadi semakin dominan dalam populasi bakteri (Andriani *et al.*, 2023). Hasil ini juga sejalan dengan penelitian lain yang melaporkan bahwa gen *blaTEM* merupakan salah satu gen ESBL yang paling sering ditemukan pada isolat klinis *Enterobacteriaceae* (Irma *et al.*, 2024).

Keberhasilan deteksi ini menunjukkan bahwa metode PCR efektif dalam mengidentifikasi gen resistensi antibiotik secara langsung. Metode ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi sehingga mampu mendeteksi gen meskipun dalam jumlah kecil (Dallenne *et al.*, 2010).

Temuan ini mengindikasikan bahwa gen *blaTEM* berperan dalam mekanisme resistensi antibiotik pada bakteri *Enterobacteriaceae* penyebab infeksi saluran kemih. Keberadaan gen ini menjadi salah satu indikator penting dalam memahami

pola resistensi, sehingga dapat digunakan sebagai dasar dalam menentukan strategi terapi yang lebih tepat (Widyawati *et al.*, 2024).

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, identifikasi bakteri hanya berdasarkan pertumbuhan pada media *MacConkey Agar* tanpa konfirmasi biokimia atau molekuler lebih lanjut, sehingga spesies bakteri penyusun isolat tidak dapat dipastikan secara definitif. Kedua, penelitian ini tidak melakukan uji resistensi maupun uji sensitivitas antibiotik secara langsung (seperti uji *disk difusi Kirby-Bauer* atau uji MIC), sehingga hasil deteksi gen *blaTEM* tidak dapat dikaitkan secara langsung dengan fenotipe resistensi antibiotik pada isolat yang diuji. Ketiga, deteksi gen hanya terfokus pada gen *blaTEM* tanpa meneliti gen ESBL lain seperti *blaSHV* dan *blaCTX-M*, sehingga hasil negatif pada penelitian ini tidak serta-merta berarti isolat tersebut tidak memiliki potensi resistensi terhadap antibiotik β -laktam.

Hasil penelitian ini tidak hanya menunjukkan keberhasilan deteksi gen *blaTEM*, tetapi juga memberikan gambaran mengenai pentingnya pendekatan molekuler dalam mengidentifikasi resistensi antibiotik pada bakteri penyebab infeksi saluran kemih.