

## **PERSENTASE KESALAHAN IDENTIFIKASI BAKTERI *Burkholderia pseudomallei* DIANTARA BAKTERI GRAM NEGATIF, OKSIDASE POSITIF YANG TERIDENTIFIKASI MENGGUNAKAN METODE VITEK 2 DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI KLINIK RSUP SANGLAH DENPASAR TAHUN 2014**

**I Wayan Rivandi Pradiyadnya Mardana<sup>1</sup>, Ni Nyoman Sri Budayanti<sup>2</sup>**

Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana,  
Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

### **ABSTRAK**

Melioidosis merupakan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif yaitu *Burkholderia pseudomallei*. Gejala yang ditunjukkan melioidosis dapat bervariasi mulai dari pneumonia hingga sepsis. Banyak kasus yang disebabkan oleh *Burkholderia pseudomallei* memiliki gejalanya yang tidak spesifik. Dari pemeriksaan laboratorium sering terdapat kesalahan identifikasi pada *Burkholderia pseudomallei*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesalahan identifikasi bakteri *Burkholderia pseudomallei* diantara bakteri gram negatif, oksidase positif yang teridentifikasi menggunakan metode Vitek 2 di laboratorium Mikrobiologi klinik RSUP Sanglah Denpasar tahun 2014. Penelitian ini menggunakan desain deskriptif observasional *cross-sectional*. Sampel merupakan Seluruh isolat bakteri batang gram negatif oksidase positif yang terisolasi dari sample klinik di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Sanglah Denpasar pada Tahun 2014 yang teridentifikasi menggunakan Vitek 2 yang telah disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dari tahun 2014 didapatkan 54 isolat bakteri gram negatif, oksidase positif yang akan dilakukan identifikasi ulang dengan menggunakan metode PCR. Hasilnya terdapat 3 isolat positif dari total 54 sampel, terlihat pada hasil elektroforesis terdapat 3 sampel yang ukurannya 550 base-pair. Dari penelitian ini didapatkan persentase kesalahan identifikasi bakteri *Burkholderia pseudomallei* diantara bakteri gram negatif, oksidase positif yang teridentifikasi menggunakan metode Vitek 2 di Instalasi Mikrobiologi klinik RSUP Sanglah pada tahun 2014 sebesar 5,5%.

**Kata kunci:** Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, Vitek 2

### **ABSTRACT**

Melioidosis is an infection caused by gram-negative bacteria named *Burkholderia pseudomallei*. Melioidosis symptoms may be vary from pneumonia to sepsis. Many cases caused by *Burkholderia pseudomallei* has non-specific symptoms. On laboratory tests, often occurred *Burkholderia pseudomallei* misidentification. This research aims to find out the *Burkholderia pseudomallei* misidentification by other positive-oxidase gram-negative bacteria who was identified by using Vitek 2 in medical microbiology laboratories Sanglah general hospital center in 2014. This study uses an observational cross-sectional descriptive design. The entire sample is oxidase-positive gram-negative bacteria which was isolated in medical microbiology laboratories Sanglah general hospital center in 2014, identified by using Vitek 2 and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In 2014 obtained 54 isolates of positive-oxidase gram-negative bacteria which will be identified by polymerase chain reaction (PCR) method. The result, there are 3 positive samples out of 54 samples available. On electrophoresis, there are 3 sample size of 550 base-pair. The result of this study shown, the percentage of *burkholderia pseudomallei* misidentification by other positive-oxidase gram negative bacteria is 5.5% who was identified by using Vitek 2 in medical microbiology laboratories Sanglah general hospital center in 2014.

**Keywords:** Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, Vitek 2

## PENDAHULUAN

Melioidosis merupakan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) yang dapat menginfeksi hewan maupun manusia.<sup>1</sup> Gejala yang ditunjukkan sangat bervariasi antar individu, mulai dari pneumonia hingga terjadinya syok septik pada kasus dengan abses organ dalam.<sup>2</sup>

Setelah pertengahan abad ke-20, melioidosis muncul sebagai salah satu masalah kesehatan masyarakat terutama di Asia Tenggara dan Australia Utara, dengan mortalitas hingga 40%. Di Thailand, melioidosis merupakan penyebab 20% bakterimia, dan di Darwin, Australia merupakan penyebab tersering bakterimia oleh karena pneumonia.<sup>3</sup> Beberapa negara di Asia Tenggara telah menjadi wilayah endemik melioidosis seperti Malaysia, Singapura, Vietnam, Kamboja, dan Laos.<sup>4</sup> Di Indonesia, saat terjadi tsunami di Aceh, ditemukan 4 dari 10 pasien dengan pneumonia teridentifikasi melioidosis.<sup>5</sup> Hingga saat ini tidak terdapat data tentang melioidosis di Bali.

Infeksi oleh *B. pseudomallei* dapat menunjukkan berbagai gejala klinis yang tidak spesifik, dengan tingkat keparahan bervariasi tergantung pada infeksi fase akut atau kronis.<sup>4</sup> Pemeriksaan kultur merupakan pilihan untuk menegakkan diagnosis definitif melioidosis.<sup>6</sup> *B. pseudomallei* dapat tumbuh pada media kultur darah yang tersedia umum, namun dapat terjadi kesalahan identifikasi sebagai bakteri gram negatif oksidase positif lainnya terutama karena lemahnya sistem identifikasi komersil yang ada saat ini untuk mengidentifikasi *B. pseudomallei*.<sup>7</sup> Beberapa masalah lain yang menyebabkan proses identifikasi menjadi sulit diantaranya terdapatnya spesies lain *Burkholderia* pada tempat pengambilan spesimen, tidak terdapat rekomendasi untuk skrining pada penderita suspek infeksi dan banyaknya variasi dalam pemeriksaan laboratorium sehingga menyebabkan tidak adanya pemeriksaan yang definitif. Hal tersebut dapat menyebabkan mis-identifikasi sebagai bakteri lain.<sup>5</sup>

Penelitian oleh Lowe dkk.<sup>8</sup> tentang perbandingan sistem *automated* dan *nonautomated* (manual) untuk mengidentifikasi *B. pseudomallei*, dengan menggunakan metode kultur terhadap 103 sampel menunjukkan paling banyak kesalahan terjadi pada sistem Vitek 2. Jenis bakteri yang teridentifikasi oleh sistem Vitek 2 adalah *B. cepacia* (24%), *Chromobacterium violaceum* (2%), dan *Pseudomonas aeruginosa* (1%). Pada pemeriksaan manual dengan API 20NE dan 20E, dengan kesalahan identifikasi 1% dan 2%, bakteri yang diidentifikasi adalah *Chromobacterium violaceum*.<sup>8</sup>

Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti tertarik untuk mengetahui persentase kesalahan identifikasi bakteri *Burkholderia pseudomallei* diantara bakteri gram negatif, oksidase positif lainnya. yang teridentifikasi menggunakan metode Vitek 2 di Bali, khususnya di laboratorium mikrobiologi klinik RSUP Sanglah Denpasar pada tahun 2014.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan sebuah penelitian deskriptif observasional *cross-sectional*. Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri batang gram negatif oksidase positif yang terisolasi dari sampel klinik di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Sanglah Denpasar pada Tahun 2014 yang teridentifikasi menggunakan Vitek 2 yang telah disimpan pada suhu -80°C. Isolat bakteri batang negatif, oksidase positif yang tumbuh tidak murni pada saat subkultur dieksklusi dari studi.

Sampel dalam bentuk cair diambil untuk dilakukan subkultur dengan media *MacConkey*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 Jam. Selanjutnya analisis DNA terhadap bakteri yang berhasil tumbuh menggunakan metode *boiling*, dilanjutkan dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR).

Formulasi PCR yang digunakan adalah formulasi *Mix*, yang terdiri dari *master mix* (promega), *Primer PPM 3 Forward* 5' AAT CAT TCT GGC TAA TAC CCG 3', *Primer PPM 4 Reverse* 5' CGG TTC TCT TTC GAG CAC G 3' dan *Nuclease Free Water*.<sup>9</sup> H<sub>2</sub>O digunakan sebagai kontrol negatif. Sebanyak masing – masing 2 µl produk PCR diambil untuk pemeriksaan elektroforesis selama 60 menit dengan tegangan listrik 50 V. Gambaran hasil dilihat dan dicetak menggunakan mesin GelDoc XR.

Hasil uji dinyatakan positif untuk *B. pseudomallei* apabila pada pemeriksaan PCR ditemukan *band* atau pita pada elektroforesis sebesar 550 base-pair dan negatif bila *band* atau pita yang ditemukan kurang atau lebih dari 550 base-pair. Mis-identifikasi adalah terjadinya perbedaan hasil identifikasi pada hasil metode Vitek 2 dengan hasil metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dari hasil tersebut dilakukan perhitungan persentase menggunakan microsoft excel .

## HASIL

Sebanyak 54 isolat klinis bakteri gram negatif, oksidase positif diujikan dalam penelitian ini dan rincian jenis bakteri ditampilkan pada tabel 1. Sampel diambil dari Urin (U), Darah (D), Sputum (SP), Pus (PS), dan Lain –lain (L) (tabel 2).

Pada awalnya PCR dilakukan dilakukan dengan suhu *annealing* 50°C. Namun karena hasil

visualisasi *band* yang didapat kurang baik, dilakukan optimalisasi dengan suhu 55°C dan didapatkan hasil 3(5,5%) dari total 54 sampel menunjukkan ukuran *band* 550bp pada gambaran elektroforesis. Ketiga sampel tersebut adalah bakteri kelompok *Pseudomonas putida*. Pada jenis kelompok bakteri lainnya hasilnya masing-masing negatif. Dari hasil tersebut didapatkan kesalahan identifikasi pada mesin Vitek 2 di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014 sebesar 5,5%.

**Tabel 1.** Daftar bakteri gram negatif, oksidase positif dari isolat klinis di instalasi mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014

Jenis Bakteri	n (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 (19)
<i>Pseudomonas putida</i>	12 (22)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	12 (22)
<i>Burkholderia cepacia</i>	8 (15)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	7 (13)
<i>Achromobacter denitrifican</i>	5 (9)
Total	54 (100)

**Tabel 2.** Daftar spesimen dari isolat klinis bakteri gram negatif, oksidase positif di instalasi mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014

Spesimen	n (%)
Urin	10 (19)
Darah	17 (31)
Sputum	8 (15)

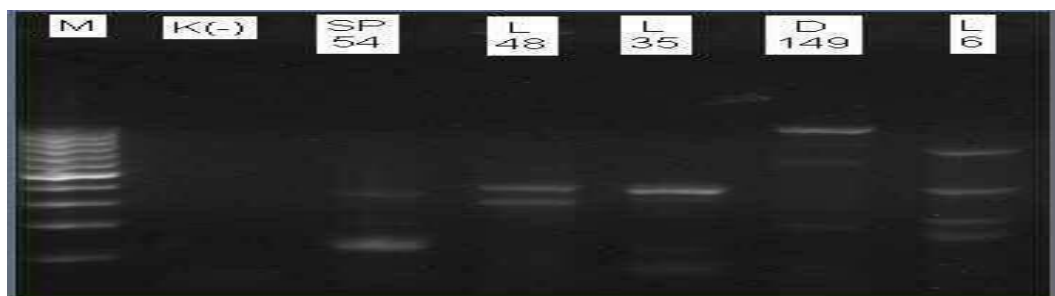
<i>Pus</i>	4 (7)
<i>Lain – lain</i>	15 (28)
Total	54 (100)

### PEMBAHASAN

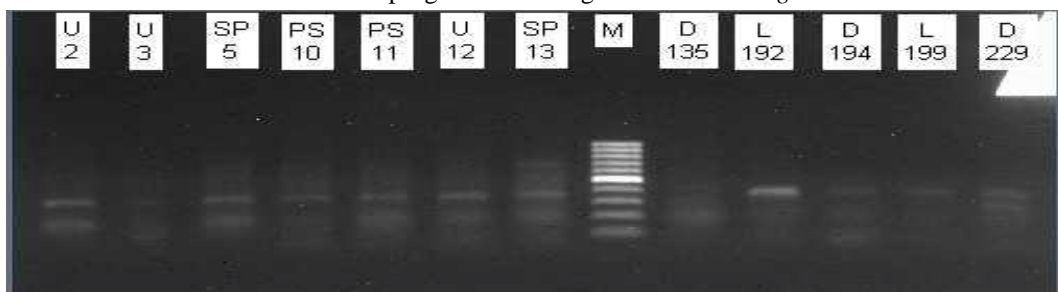
Program PCR pertama menggunakan suhu annealing 50°C, dan karena bertujuan untuk melakukan optimasi, peneliti hanya menggunakan 5 buah sampel dan 1 kontrol negatif. Setelah di PCR dan elektroforesis didapatkan hasilnya terdapat gambaran 2 sampai 4 pita pada beberapa sampel (gambar 1). Karena visualisasi *band* yang didapatkan belum optimal selanjutnya dilakukan optimasi dengan menaikkan ke suhu 55° C.

Pada optimasi kedua didapatkan gambar yang lebih bagus dibandingkan sebelumnya, akan tetapi hasil PCR masih menunjukkan terdapat sampel dengan lebih dari 1 *unspecific band* (gambar 2) (gambar 3). Hal ini bisa disebabkan oleh suhu yang kurang optimal, tetapi jika suhu *annealing* dinaikan dikhawatirkan *band* akan sama sekali tidak terlihat atau *blank*. Oleh karena itu peneliti tetap menggunakan suhu *annealing* tersebut agar hasil dari PCR bisa terlihat. Jika peneliti menaikkan suhu ke 60°C akan terlihat hasilnya *blank* dan itu bisa saja menunjukkan bahwa reaksi PCR yang dibuat tidak berjalan. Maka dari itu peneliti menggunakan program PCR dengan suhu *annealing* 55°C untuk mengidentifikasi semua sampel.

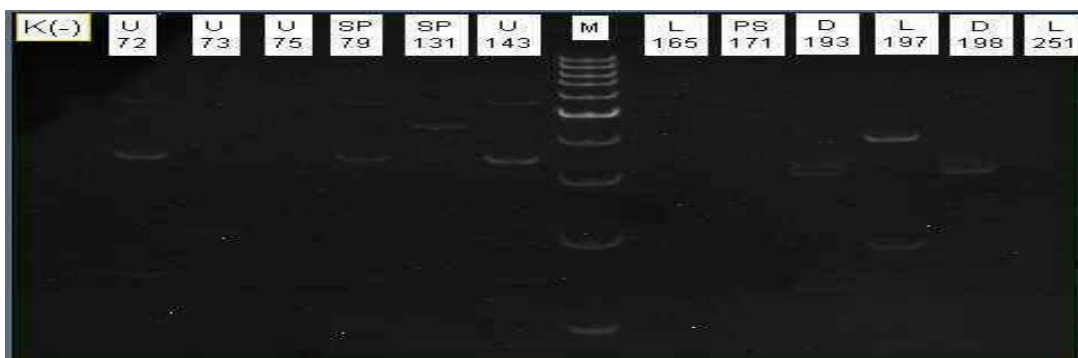
Setelah semua sampel diuji dengan teknik PCR didapatkan 5,5% sampel kelompok bakteri *Pseudomonas putida* menunjukkan hasil positif untuk *B. pseudomallei*.



**Gambar 1.** Hasil program PCR dengan suhu *annealing* 50° C



**Gambar 2.** Hasil program PCR dengan suhu *annealing* 55° C



**Gambar 3.** Hasil program PCR dengan suhu *annealing* 55° C

**Tabel 3.** Hasil PCR bakteri gram negatif, oksidase positif dari isolat klinis di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014

Jenis Bakteri	Positif n (%)	Negatif n (%)	Total Sample n (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0)	10	10 (19)
<i>Pseudomonas putida</i>	3 (5,5)	9	12 (22)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0 (0)	12	12 (22)
<i>Burkholderia cepacia</i>	0 (0)	8	8 (15)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0 (0)	7	7 (13)
<i>Achromobacter denitrifican</i>	0 (0)	5	5 (9)
<b>Total</b>	<b>3 (5,5)</b>		<b>54 (100)</b>

Dengan demikian persentase kesalahan identifikasi pada mesin Vitek 2 di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014 didapatkan sebesar 5,5%.

Hal ini berbeda jika di dibandingkan dengan Penelitian oleh Lowe dkk.<sup>8</sup> yang menemukan bahwa mis-identifikasi paling banyak terjadi pada metode Vitek 2. Sistem otomatis dengan menggunakan metode Vitek 1 dan Vitek 2 memberikan hasil 1% dan 19% yang disebabkan karena banyaknya perbedaan reaksi biokimia yang didapat dibandingkan dengan nilai yang terdapat dalam database.<sup>8</sup>

PCR dipilih sebagai metode identifikasi oleh peneliti karena menurut penelitian oleh Inglis dkk.<sup>7</sup> untuk membandingkan metode untuk identifikasi *Burkholderia pseudomallei* yaitu, API 20NE, *Gas-liquid chromatography analysis of bacterial fatty acid methyl esters* (GLC-FAME), dan PCR, menunjukkan hasil identifikasi benar *Burkholderia pseudomallei* beturut-turut 37%, 94%, dan 98%. Metode identifikasi PCR memiliki persentase yang cukup baik.<sup>7</sup>

### SIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan persentase kesalahan identifikasi bakteri *Burkholderia pseudomallei* dengan bakteri gram negatif, oksidase positif yang teridentifikasi menggunakan metode Vitek 2 di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah pada tahun 2014 cukup rendah yaitu sebesar 5,5%.

Penelitian ini dapat dilakukan penelitian lanjutan berupa *sequencing* pada sampel yang diduga positif untuk lebih memastikannya. Nantinya hasil tersebut bisa digunakan untuk dijadikan kontrol positif dan bisa dikembangkan untuk penelitian bakteri *Burkholderia pseudomallei* atau penelitian tentang melioidosis di Bali. Adapun kelemahan pada penelitian ini adalah waktu yang singkat dan tidak adanya kontrol positif.

### DAFTAR PUSTAKA

- Inglis, T. J. J. The Treatment of Melioidosis. *Journal Pharmaceuticals*. 2010; 3: 1296-1303.

2. Currie, B. J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: Melioidosis and Glanders. 2010; 2869-2878.
3. Cheng, A. C., Currie, B. J. Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (2): 383-416.
4. Wiersinga, W. J., Currie, B. J., Peacock, S. J. Medical Progress : Melioidosis. *The New England Journal of Medicine.* 2012; 367 (11): 1035-1042.
5. Inglis, T. J. J., Rolim, D. B., Rodriguez, J. L. N. Clinical Guideline For Diagnosis And Management of Melioidosis. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2006; 48(1): 1-4.
6. Currie, B. J., Ward, L., Cheng, A. C. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(11):e900.
7. Inglis, T. J. J., Merritt, A., Chidlow, G., Roman M.A., Harnett G. Comparison of Diagnostic Laboratory Methods for Identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2201-2206.
8. Lowe, ., Engler, C., Norton, R. Comparison of Automated and Nonautomated Systems for Identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (12): 4625-4627.
9. Brook, .D.,dkk. Isolation and Identification of *Burkholderia pseudomallei* From Soil Using Selective Culture Techniques and The Polymerase Chain Reaction. University of Queensland : Brisbane Australia. 1997; p. 590.

6. Currie, B. J., Ward, L., Cheng, A. C. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin

<https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>