

TINJAUAN PUSTAKA

Pendekatan Molekuler (RISA) untuk Membedakan Spesies Bakteri Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif

Anton Christanto, Soepomo Soekardono, Agus Surono,
Novi Primadewi, Roikhan Harowi

Bagian Ilmu Penyakit Telinga Hidung Tenggorok Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/
SMF THT Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito Yogyakarta, Indonesia

PENDAHULUAN

Pada mukosa cavum timpani penderita Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif (OMSKBA), telah terjadi banyak perubahan-perubahan yang menetap, sehingga resolusi spontan sangat sulit terjadi dan biasanya ada gangguan vaskularisasi di telinga tengah, sehingga antibiotika sistemik sulit mencapai sasaran dengan optimal; oleh karena itu diperlukan antibiotika topikal. Kronisitas dengan fase aktif dan fase tenang yang bergantian dapat terjadi sepanjang umur sehingga diperlukan antibiotika pada setiap fase aktif. Tidak jarang kasus kasus OMSK membandel terhadap pengobatan dengan kesembuhan yang tidak sempurna bahkan gagal sama sekali.

Antibiotika yang diberikan adalah atas dasar hasil uji kepekaan *in vitro* terhadap bakteri aerob. Pada pemeriksaan bakteriologik (mikrobiologik), penemuan jenis kuman yang sama pada media kultur, sering kali menghasilkan hasil uji kepekaan yang berbeda.

Pada akhir-akhir ini terlihat kecenderungan terjadinya perubahan dalam jenis kuman penyebab penyakit infeksi serta respon kuman terhadap antibiotika.¹

Akibat perkembangan terapi antibiotika, insidensi dan prevalensi OMSK menurun, tetapi penurunan ini tidak sebaik penyakit infeksi lainnya terutama pada kasus anak. Seperti dimaklumi hilangnya fokus infeksi di telinga tengah penting untuk penyembuhan spontan dari kerusakan akibat penyakit infeksi tersebut.^{2,3}

Pada umumnya pemberian antibiotika untuk OMSKBA didasarkan pada “*educated guess*” yaitu berdasarkan laporan terakhir mengenai bakteri yang paling sering ditemukan pada OMSKBA.⁴

Pemeriksaan bakteriologik OMSKBA selama ini dilakukan melalui pemeriksaan isolasi dengan media kultur. Identifikasi kuman didapatkan dengan melihat morfologi

koloni kuman dalam media kultur dalam sebuah *plate* dan uji biokimia. Dari hasil pemeriksaan bakteriologik tersebut kuman yang sering ditemukan pada OMSK bervariasi. Pada umumnya ditemukan *Pseudomonas spp*, dengan persentase antara 16%-100%, *Staphylococcus aureus* 9%-32%, *Enterobacter spp* 3%-30%, *H. influenzae* 12%, *Streptococcus* 15% dan kuman lain kadang-kadang ditemukan dalam persentase kecil.^{5,1,6,7} Temuan kuman anaerob meningkat dari 1% menjadi 43% berkat perbaikan teknik pemeriksaan bakteriologik.⁸

Secara *taxonomy term* (klasifikasi) pemeriksaan bakteriologik dengan media kultur tersebut hanya bisa mengidentifikasi jenis kuman setingkat genus maupun spesies. Pemeriksaan bakteriologik dengan media kultur tidak bisa membedakan jenis kuman yang masih dalam satu spesies.

Dengan kemajuan biologi molekuler, teknik PCR-RISA dapat membedakan jenis kuman antar spesies atau *strain* dari satu spesies.^{9,10}

Tujuan penelitian ini adalah melihat gambaran pola kuman dari hasil isolasi sekret telinga OMSKBA pada media kultur dengan pendekatan PCR.

TINJAUAN PUSTAKA

Otorea kronis adalah keluarnya cairan dari telinga lebih dari 2 bulan. Selanjutnya dengan otoskopi dibedakan ada tidaknya perforasi pada membran timpani. Apabila membran timpani perforasi, diagnosis mengarah pada OMSK.

Definisi OMSK adalah radang kronis telinga tengah dengan perforasi membran timpani dan riwayat keluarnya sekret dari telinga (otorea) lebih dari 2 bulan, baik terus menerus atau hilang timbul. Sekret mungkin serous, mukus atau purulen.¹¹ Pada OMSK tanpa komplikasi dinilai apakah ada kolesteatom atau tidak. OMSK tanpa kolesteatom disebut sebagai OMSK benigna atau tipe mukosa dan yang disertai

kolesteatom disebut sebagai OMSK maligna atau bahaya.¹²

OMSK benigna dibagi menjadi fase tenang dan aktif. Fase tenang jika OMSK tersebut adalah OMSK tipe mukosa dalam keadaan kering. Jika ada *discharge* maka disebut fase aktif (OMSKBA).

KEKERAPAN

Di seluruh dunia prevalensi OMSK 65330 juta jiwa, 60% (39200 juta jiwa) mengalami gangguan pendengaran yang sangat klinis bermakna. Diperkirakan 28000 mengalami kematian dan < 2 juta mengalami kecacatan; 94% terdapat di negara berkembang.¹³ Prevalensi OMSK di Indonesia secara umum adalah 3,8%.¹² Pasien OMSK merupakan 25% dari pasien-pasien yang berobat di poliklinik THT RS Dr Sardjito Yogyakarta tahun 2004.

Gambaran bakteriologi pada OMSKBA

Beberapa penulis melaporkan *P.aeruginosa* merupakan bakteri aerob yang paling sering ditemukan, walaupun persentasenya berbeda-beda.^{1,14-18}

Friedman (1952) (dikutip oleh Shenoi⁷) menemukan *S.aureus* sebesar 32,7% dari 318 kasus dan 41% resisten dengan penisilin, *Proteus* 27%, *Pseudomonas aeruginosa* 16%, *E.coli* 10,7%.

Jonsson (1986)¹⁶ menemukan 32% *Pseudomonas spp*, dengan spesies tersering adalah *Ps. aeruginosa*. *Staphylococcus aureus* sebesar 30%, dan batang gram negatif lain 32%. Spesimen diambil dari telinga tengah.

Fliss¹⁶ mendapatkan *Pseudomonas spp* 100% dari 77 spesimen yang diperiksa, kuman enterik gram negatif (*E.coli*, *Enterobacter spp*, *Proteus mirabilis*, lain lain) sebesar 33%, *Staphylococcus* 25%. Tidak dilakukan pemeriksaan terhadap kuman anaerob

Papastavros¹⁷ melaporkan bakteri aerob pada 84,03% spesimen, dengan *Pseudomonas sp* sebesar 50,67%, *S.aureus* 36,00%.

Amadasun¹⁸ melaporkan *Pseudomonas sp* sebesar 65%, *Proteus sp* 26%, *Streptococcus sp* 15%, *Staphylococcus sp* 12%.

Leiberman¹⁴ pada penelitian kuman aerob pada OMSKBA mendapatkan *Pseudomonas spp* pada semua kasus (100%), *Enteric gram negative bacilli* 33%, *Staphylococcus* 25%, *Haemophilus influenzae* 12%.

Kenna⁵ (1986) melaporkan hasil pemeriksaan mikrobiologi pada 51 biakan dari 36 penderita (anak) OMSKBA terdiri dari 23 spesies, antara lain *P.aeruginosa* sebesar 67% dan merupakan kultur murni pada 31% kasus (16 telinga). Pada 15 anak dengan OMSK bilateral, 73% mengandung kuman yang sama di kedua telinga tengahnya. *S.aureus (beta lactamase positive species)* sebesar 9,3%, *diphtheroids* 9,3%, *S. epidermidis* 6,4%.

Hariasri¹⁹ pada penelitian kuman OMSKBA dengan pengambilan spesimen menggunakan lidi kapas mendapatkan *Pseudomonas* sebesar 59,01%, *Staphylococcus* 31,14%, *Difteroid* 16,39% dan *Proteus* 9,84%.

Pemeriksaan bakteriologi dengan media kultur pada OMSKBA

Saat pengambilan sekret telinga harus diperhatikan sterilitasnya; diusahakan tidak ada kontaminasi dari kulit *canalis auditorius externus* dengan teknik : kulit dibersihkan dengan jodium dan alkohol 70%; kontaminasi dari udara luar dihindari dengan meletakkan lampu spiritus di depan lubang botol steril berisi media transport saat memasukkan spesimen ke dalamnya.

Pengambilan sekret/*discharge* menggunakan jarum no 20 yang dihubungkan dengan semprit ukuran 1 atau 2,5 ml.² Setelah sekret diambil, segera dimasukkan ke tabung yang berisi media transport yaitu media setengah padat yang tersusun oleh:

- Medium Carry dan Blair (BBL) 2,5 gram
- Solutio CaCl₂ 1% 1,8 ml
- Solutio Rezasurin 0,1 gram
- L Cystein HCl 0,1 gram
- Distillated water 198 ml

Selanjutnya tabung dikirim segera ke bagian Mikrobiologi. Setiap bahan ditanam di dalam media agar darah. Kemudian koloni yang tumbuh diisolasi dan diidentifikasi dengan teknik *pure culture* (kultur murni). Identifikasi kuman didasarkan pada morfologi koloni kuman yang tumbuh pada media kultur (agar darah) dan uji biokimia. Identifikasi bakteriologi dalam tubuh manusia (dalam hal ini sekret telinga penderita OMSKBA) masih mengandalkan teknik kultur murni.

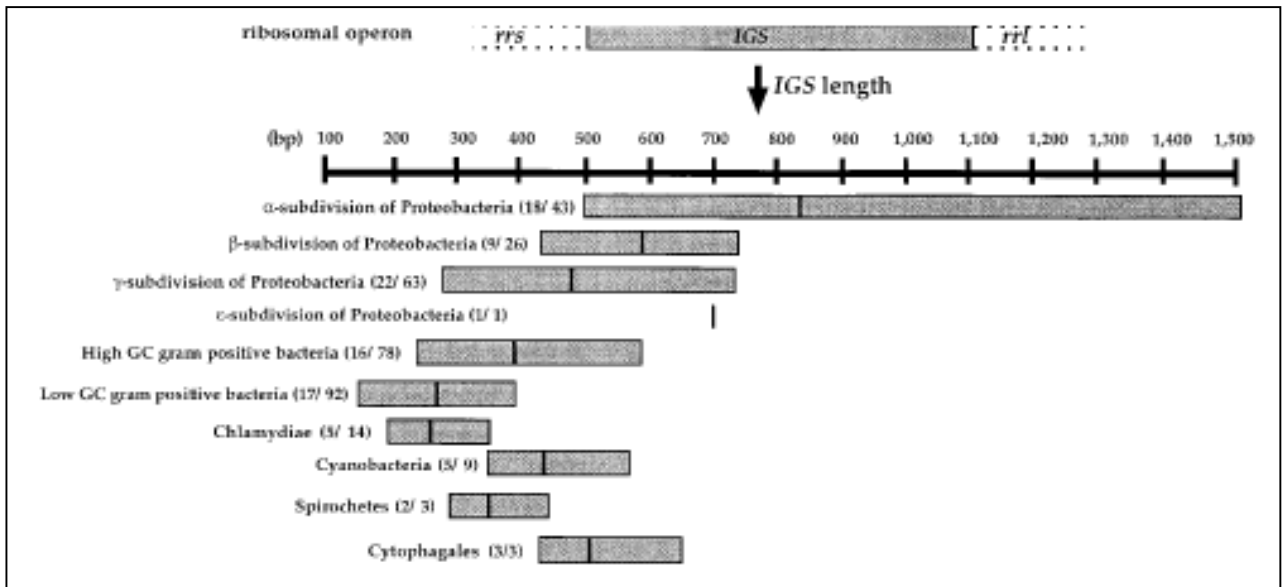
PCR (Polymerase Chain Reaction) – RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analyse)

Sekarang telah dikembangkan teknik identifikasi mikrobakterium dengan metode biologi molekuler seperti PCR. Sebagian teknik ini sudah menggunakan analisis molekuler yakni sekuen gen rRNA. Banyak laboratorium yang menggunakan teknik molekuler berdasarkan rRNA untuk mengidentifikasi kuman patogen dan kuman komensal.

Metode RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) berdasarkan panjang polimorfisme dari sekuen *intergenic spacer* (IGS) antara gen subunit rRNA yang kecil (16s) dan yang besar (23s) yang dapat mengamplifikasi primer eubakterial universal langsung dari komunitas.

Kemajuan di bidang biologi molekuler telah dapat mengembangkan komunitas bakterial dengan menggunakan metode DNA *fingerprinting* sehingga dapat memantau kompleks komunitas bakteri di lingkungan alamiah tanpa isolasi.

Metode ini melibatkan ekstraksi DNA *insitu* dari komunitas bakteri menggunakan amplifikasi sekuens PCR sehingga didapatkan informasi genetik yang lebih detail. Sekuens yang digunakan sebagai tanda dari komunitas bakterial ini adalah gen dari ribosomal operon rRNA. *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)* adalah metode analisis mikrobiologi komunitas yang dapat memperkirakan keanekaragaman agen mikrobiologi dalam komposisi komunitas tanpa melihat *bias* yang dihasilkan dari pendekatan



metode kultur. Metode ini melibatkan penggunaan amplifikasi PCR berdasarkan panjang polimorfisme dari sekuen *intergenic spacer* (IGS) dari regio kecil (16s) dan yang besar (23s) dari gen subunit rRNA dalam rRNA operon, dengan target primer oligonukleotida dalam regio 16s dan 23s. region intergenic 16s-23s, yang mengkode tRNAs tergantung dari macam species bakterial, yang diketahui dari heterogenitas panjangnya dan sekuens nukleotida

Metode RISA merupakan metode ekologi molekuler⁹ yang dapat digunakan untuk mengamati ekologi bakteri pada lingkungan alamiah. Metode RISA memiliki prospek dalam kegunaannya untuk mempelajari komposisi komunitas mikrobia baik untuk identifikasi genus, spesies atau pengelompokan phylogenetik dan mengamati perubahan lingkungan yang terjadi.⁹

RISA merupakan metode yang sangat baik untuk mengamati struktur dan dinamisasi komunitas bakteri yang sangat kompleks melalui perubahan pita-pita DNA. RISA dapat digunakan untuk mengidentifikasi populasi yang terjadi dalam suatu komunitas.⁹

RISA merupakan analisis polimorfis dari bagian yang memisahkan gen *rrs* dan *rrl* IGS (*intergenic spacer*) yang memiliki variasi ukuran dari 50bs sampai 1,5 kb.

Rangkaian beberapa pita DNA dapat menunjukkan secara spesifik keberadaan populasi dalam suatu komunitas. Variasi bagian teramplifikasi dari IGS dapat dengan langsung dipisahkan atas dasar ukurannya menggunakan gel poliakrilamid. Variabilitas ukuran yang tinggi menunjukkan adanya variabilitas yang tinggi dalam struktur genetik komunitas.⁹

Gambar di atas menunjukkan panjang daerah distribusi IGS antara gen *rrs* dan *rrl* pada kelompok eubakteria & menunjukkan rata-rata panjang daerah IGS untuk tiap filum.

Kelompok **α -proteobacteria**, terdiri atas : *Hyphomicrobium*, *Blastobacter*, *Rhodobacter*,

Rhodopseudomonas, *Bartonella*, *Nitrobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Candidatus*, *Zymomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Ochrobactrum*, *Brucella*, *Caulobacter*, dan *Ehrlichia*; **β -proteobacteria**, terdiri atas: *Acidithiobacillus*, *Thiobacillus*, *Ralstonia*, *Nitrosospira*, *Nitrosomonas*, *Burkholderia*, *Xylophilus*, *Nitrosolobus*, *Neisseria*, dan *Microvirgula*; **γ -proteobacteria**, terdiri atas: *Yersinia*, *Photobacterium*, *Azotobacter*, *Haemophilus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Thiobacillus*, *Dichelobacter*, *Piscirickettsia*, *Xylella*, *Erwinia*, dan *Pectobacterium*; **ϵ -proteobacteria**, terdiri atas: *Campylobacter*; **high-GC-content gram-positive bacteria**, terdiri atas : *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Frankia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbispora*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Rorybacterium*, *Tropheryma*, *Thermomonas*, *Spirillospora*, *Excelllospora*, *Actinocorallia*, dan *Actinomadura*; **low-GC-content gram-positive bacteria**, terdiri atas: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Achole-plasma*, *Anaeroplasma*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Phytoplasma*, *Lactococcus*, *Pectinatus*, *Zymophilus*, dan *Planococcus*; **chlamydiae** terdiri atas : *Chlamydia*, *Chlamydomydia*, *Simkania*, *Parachlamydia*, dan *Waddlia*; **cyanobacteria** terdiri atas: *Microcystis*, *Spirulina*, *Trichodesmium*, *Arthrospira*, dan *Anacystis*; **spirochetes**, terdiri atas : *Leptonema* dan *Treponema*; dan **cytophagales**, *Prevotella*, *Rhodothermus*, dan *Flavobacterium*.⁹

Metode RISA ini berdasar pada panjang sekuen *Spacer intergenic* yang berbeda di antara gen penyandi sub-unit rRNA kecil (16S) dan besar (23S) yang diamplifikasi dengan primer universal untuk eubakteria.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *cross sectional study*, merupakan penelitian eksperimental dan *preliminary study*.

B. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah semua pasien Poliklinik THT RS Dr. Sardjito Yogyakarta yang didiagnosis OMSKBA yang datang selama jangka waktu penelitian.

Kriteria inklusi:

- Penderita OMSK benigna aktif yang datang berobat ke poliklinik THT FK UGM/RSUP Dr Sardjito
- Pada pemeriksaan otoskopi, didapatkan perforasi subtotal atau total

Kriteria eksklusi:

- Penderita menggunakan antimikroba sistemik atau topikal paling sedikit 7 hari sebelum pemeriksaan
- Menderita penyakit berat atau infeksi lain
- Penderita otitis eksterna
- Menolak ikut serta dalam penelitian.

C. Sampel

Sampel penelitian adalah sampel sekret/congek penderita OMSK benigna aktif yang diambil dari telinga pasien.

Besar sampel: 5 pasien

D. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Poliklinik THT RS Dr. Sardjito Yogyakarta, di Laboratorium Mikrobiologi FK-UGM dan Laboratorium Pusat Studi-Bioteknologi UGM dari tanggal 1 April 2005 sampai dengan 31 Mei 2005.

E. Cara Penelitian

A. Pemilihan sampel.

- a. tempat : Rumah Sakit Dr Sardjito unit THT FK UGM
- b. waktu : bulan April 2005
- c. bahan. : *discharge* diambil dari 5 penderita yang di diagnosis OMSK Benigna aktif. (lihat pendahuluan).

Pemilihan sampel sesuai kriteria inklusi dan eksklusi ; tidak ada pembatasan umur, jenis kelamin penderita serta telinga yang kanan atau yang kiri.

Setiap pasien hanya diambil *dischargenya* dari satu telinga saja.

Pasien harus bebas antibiotika paling sedikit 7 hari sebelum pemeriksaan

B. Pengambilan Sampel

Sampel/spesimen diambil dengan cara sebagai berikut :

1. Sebelum mengambil spesimen, diperhatikan sterilitas.
2. Spesimen diusahakan sejauh mungkin harus steril dengan melakukan desinfeksi (alkohol) di daerah kulit canalis auditoris externus. untuk menghindari kontaminasi kuman dari daerah tersebut.
3. Spesimen diambil segera.
4. Alat untuk mengambil material sekret berupa kateter intra vena ukuran 20G dan semprit 1ml.
5. Proses pengambilan spesimen memakai sarung tangan steril.
6. Spesimen dimasukkan ke dalam tabung media transport yang panjangnya 12 cm dan bergaristengah 1,5cm, tabung lalu ditutup kapas.

7. Tabung media transport yang berisi media kultur dan spesimen dikirim ke Lab Mikrobiologi FK UGM untuk di isolasi di media kultur (agar darah) dan diidentifikasi jenis kumannya.

8. *Plate* (media kultur) berisi isolasi bakteri yang telah tumbuh koloninya dikirim ke Lab PS-Bioteknologi UGM untuk menjalani proses ekstraksi DNA dan diidentifikasi dengan teknik PCR-RISA

9. Pengiriman spesimen disertai formulir yang memuat catatan: nama, alamat, umur dan jenis kelamin penderita, jenis spesimen yang dikirim, tanggal pengambilan spesimen, gejala /diagnosis penyakit.

C. Pengolahan sampel

Spesimen dalam tabung media transport diisolasi dalam media kultur agar darah dalam *plate*, lalu diidentifikasi dan didifrensiasi di Lab Mikrobiologi FK-UGM Yogyakarta..

Plate (media kultur) yang berisi isolasi dan koloni kuman dibawa ke laboratorium Pusat Studi Bioteknologi UGM untuk menjalani ekstraksi DNA. Setelah itu dilakukan PCR-RISA. Sesudah PCR selesai, produk PCR di elektroforesis. Setelah itu dilihat di transiluminator u.v., dan difoto dengan menggunakan kamera digital. Metoda analisis yang dipakai adalah RISA. (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

Esktraksi DNA dan PCR dikerjakan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Bioteknologi UGM.

Pemeriksaan bakteriologi menggunakan metoda PCR-RISA

Bahan: Tris-HCl, EDTA, SDS, lisosim, CTAB, NaCl, kloroform, isopropanol, etanol 70 %.

Prosedur kerja

Sebanyak 1.5 ml kultur sel dalam tabung 1.5 ml disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang.

Pelet hasil sentrifugasi ditambahi 500 µl TE (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA; pH 8), vortex hingga homogen. Ditambahkan 40 µl lisosim (50 mg/ml) dan inkubasi pada 37°C selama 60 menit. Tambahkan 200 µl SDS 10 %, 100 µl NaCl 5 M, dan 80 µl CTAB lalu inkubasi pada 68°C selama 30 menit (sampel dibolak-balik setiap 10 menit). Dilakukan penambahan 1:1 chloroform dan sentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas diambil dan tambahkan 0.6 x volume isopropanol kemudian disentrifugasi kembali 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan cuci pelet dengan 100 µl etanol 70 % dan kering anginkan. Tambahkan 20 µl TE dan homogenkan. Untuk sampel langsung tanpa menggunakan teknik kultur, dilakukan prosedur yang sama dengan teknik dikulturkan, hanya sampel yang digunakan langsung ditambahi 500 µl TE.

Polymerase Chain Reaction → Primer, Reagen, siklus termal
Reagen: Primer; 1406F (5'>TGYACACACCGCCCGT<3')
(universal rRNA small subunit)
23SR (5'>GGGTTBCCCCATTCRG<3')
(bacterial 23S rRNA large subunit)
Ready To Go (Amersham Biosciences);
2.5 unit *Taq polymerase*
10 mM Tris HCl (pH 9)

50 mM KCl

1.5 mM Mg200 µl dNTP + stabilizer + BSA

Siklus PCR: denaturasi awal 94°C selama 2 menit, proses selanjutnya sebanyak 25 siklus yang terdiri dari denaturasi (15 detik pada suhu 94°C), penempelan primer (15 detik pada suhu 56°C), elongasi (30 detik pada 72°C). Setelah akhir siklus, elongasi dilanjutkan pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian proses dihentikan dengan mengatur suhu pada 4°C dan hasilnya divisualisasi dengan 1.5 % agarose.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Sampel

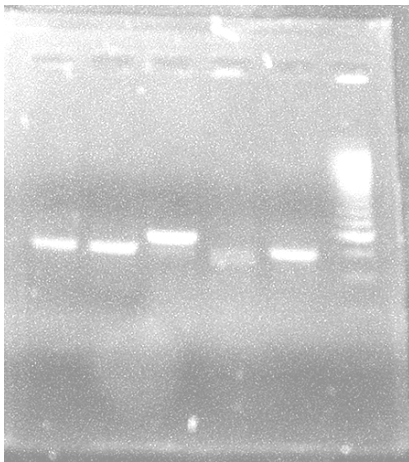
	Sampel/Spesimen				
	I	II	III	IV	V
Umur	22 th	31 th	21th	27th	5th
Jenis Kelamin	Laki	perempuan	perempuan	Laki	perempuan
Alamat	Bantul	Sleman	Sleman	Sleman	Sleman

Pemeriksaan Bakteriologis dengan media kultur

	Sampel/Spesimen				
	I	II	III	IV	V
Jenis Kuman	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp</i>

Hanya didapatkan 1 jenis genus *Pseudomonas spp* (sampel I, II, III, V) dan 1 jenis spesies *P.aeruginosa* (sampel IV)

Pemeriksaan Bakteriologis dengan PCR-RISA



Sampel I II III IV V M
M : marker → 100bp ladder

Tampak gambaran genus *Pseudomonas* yang tidak sama. Mungkin merupakan spesies/strain *Pseudomonas* yang berbeda.

PEMBAHASAN

PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial sel nukleotida tertentu secara *in vitro*.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan migrasi DNA pada agarose yaitu: 1. Konsentrasi agarose 2. Berat molekul DNA dan 3. Struktur DNA.

Dari hasil visualisasi terlihat adanya pola migrasi yang berbeda dari DNA bakteri *Pseudomonas*. Hasil PCR dengan menggunakan primer RISA pada agarose 1,5% tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan struktur DNA. Hal tersebut tampak pada hasil penelitian pemeriksaan bakteriologis dengan PCR-RISA, yaitu adanya perbedaan struktur DNA antara hasil PCR dari sampel I sd. sampel V .

Selain faktor struktur DNA, perbedaan pola migrasi dari sampel DNA bakteri yang diduga satu genus dapat pula disebabkan oleh perbedaan panjang sekuens yang teramplifikasi karena IGS sangat spesifik untuk setiap spesies bakteri; sehingga mungkin genusnya sama pseudomonas tetapi spesiesnya berbeda.

Hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa pendekatan biologi molekuler yaitu RISA dapat membedakan beberapa strain/spesies *Pseudomonas* dari cairan telinga penderita Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif, sedangkan dengan pendekatan tradisional yaitu pembiakan pada medium agar darah, bakteri yang diperoleh hanya dapat dibedakan menjadi 2 macam bakteri yaitu *Pseudomonas sp* dan *P. aeruginosa*. Hasil ini mengindikasikan bahwa RISA dapat membedakan bakteri lebih seksama dibandingkan dengan pendekatan tradisional. Hasil ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang juga mampu membedakan spesies dari kelompok Cyanobacteria²⁰, dan dari kelompok Bacillus.^{21,22}

Dari beberapa penelitian ini dan penelitian sebelumnya tampak bahwa RISA merupakan alat yang sangat baik untuk pembedaan bakteri-bakteri hasil isolasi karena memungkinkan pembedaan pada aras spesies.

Pendekatan ini mungkin juga sangat berguna dalam karakterisasi strain bakteri yang menunjukkan variabilitas tinggi dalam kelompok-kelompok bakteri yang secara taksonomi sangat dekat.

Pemanfaatan RISA dalam pembedaan bakteri penyebab penyakit akan sangat bermanfaat terutama jika dikaitkan dengan resistensi mereka terhadap antibiotik. Pembedaan bakteri dengan metode RISA mungkin dapat menjelaskan mengenai resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik.

KESIMPULAN

1. Pendekatan molekuler (RISA) lebih unggul/sensitif dalam membedakan bakteri yang diisolasi dari sekret telinga penderita Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif (OMSKBA) dibandingkan dengan pendekatan tradisional (didasarkan pada pengamatan morfologi kultur/koloni bakteri pada media kultur / *pure culture*).
2. RISA memungkinkan pembedaan bakteri patogen penyakit infeksi di telinga (OMSKBA) pada aras spesies bahkan pada aras intra spesies.

KEPUSTAKAAN

1. Kenna MA, Rosane BA, Bluestone CD. Medical Management of Chronic Suppurative Otitis Media without Cholesteatoma in Children-Update 1992. Am J Otol 1993; 14:469-73

2. Papastavros T, Giamarellou H, Varledjides S. Obtaining Specimens of Discharge from the Middle Ear for Cultures. *Laryngoscope* 1985; 95:1413-1414
3. Kenna MA. Epidemiology and Natural History of Chronic Suppurative Otitis Media. *Ann. Otol Rhinol Laryngol.* 1988; 95 (Suppl.131);8
4. Istioro YH. Penggunaan Antibiotik pada Otitis Media Supuratif Kronik. In: Helmi eds. Pengobatan Non Operatif Otitis Media Supuratif Kronik. Jakarta. Balai Penerbit FKUI. 1990:7-16.
5. Kenna MA, Bluestone CD, Reilly JS. Medical Management of Chronic Suppurative Otitis Media without Cholesteatoma in Children. 1986; 96:146-51.
6. Jonsson L, Schwan A, Thomander L et al. Aerobic and Anaerobic Bacteria in Chronic Suppurative Otitis Media (a quantitative study). *Acta Otolaryngol.* Stockh.1986; 102:410-414.
7. Shenoj PM. Management of Chronic Suppurative Otitis Media. In: Kerr GA. Scott-Brown's Otolaryngology (Otology). Fifth ed. Butterworths. 1987:215-237.
8. Papastravos T, Giamarellou, Varlejides S. Role of Aerobic and Anaerobic Microorganisms in Chronic Suppurative Otitis Media. *Laryngoscope* 1986; 96: 438-442.
9. Ranjard L, Brothier E, Nazaret S. Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000: 5334-5339.
10. Yu Z, Mohn WW. Bacterial Diversity and Community Structure in an Aerated Lagoon Revealed by Ribosomal Intergenic Spacer Analyses and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Appl. and Environmental Microbiol.* 2001; 67 (4):1565-1574
11. Djaafar ZA. Kelainan telinga tengah. Dalam buku ajar Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Kepala Leher. Eds. Supardi E, Iskandar N. 2001:Hal 49-62.
12. Helmi, Djaafar ZA, Sosialisman, Hafil AF, Ratna D. Panduan penatalaksanaan baku Otitis Media Supuratif Kronik di Indonesia. Eds. Soetjipto D, Mangunkusumo E, Helmi. Jakarta 2002 ; 9-10
13. WorldHealthReport,2000.<http://www.who.int/whr/2001/archives/2000/en/pdf/Annex4-en.pdf> (accessed 21 July 2003).
14. Leiberman A, Fliss DM, Dagan R. Medical Treatment of Chronic Suppurative Otitis Media without Cholesteatoma in Children-a Two Year Follow-up. *Internat. J Pediatr. Otorhinolaryngol.* 1992:24;25-33.
15. Bluestone CD, Kenna MA. Consensus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97 (suppl.131):41-42.
16. Fliss DM et al. Medical Management of Chronic Suppurative Otitis Media without Cholesteatoma in Children. *J.Pediatr.* 1990 ;116:991-996.
17. Papastravos T, Giamarellou, Varlejides S. Role of Aerobic and Anaerobic Microorganisms in Chronic Suppurative Otitis Media. *Laryngoscope* 1986; 96:438-442.
18. Amadasun JEO. Bacteriology of Inadequately Treated Active Chronic Otitis Media in Paediatric Age Group. *J Laryngol Otol* 1991; 105:341-342.
19. Hariasri S. Otitis Media Supuratif Kronik : Latar belakang dan evaluasi pengobatan konservatif. Skripsi bagian THT FKUI. Jakarta: FKUI 1983.
20. Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria..*Mol Biol Evol.* 2001 Jun;18(6):1057-69.
21. Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora A, Boudabous A, Borin S. Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA Gene Intergenic Transcribed Spacer Fingerprinting of *Bacillus* and Related Genera. *Appl and Environmental Microbiol.* 2003; 69(9): 5128-5137.
22. Xu, D, Cote, JC. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 695-704.

*It is ironic habit of human beings to run faster when we
have lost our way*

Rollo May (1909-1954)