

**IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN BERBASIS METAGENOMIK  
NGS-ONT SEBAGAI MODEL PEMERIKSAAN SEPSIS AWITAN DINI  
BAYI PREMATUR DI RUMAH SAKIT  
ABDOEL MOELOEK**

**HASIL DISERTASI**

**Oleh Leni Ervina**

**NPM 2337061005**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2026**

**IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN BERBASIS METAGENOMIK  
NGS-ONT SEBAGAI MODEL PEMERIKSAAN SEPSIS AWITAN DINI  
BAYI PREMATUR DI RUMAH SAKIT  
ABDOEL MOELOEK**

**Oleh**

**Leni Ervina**

Disertasi  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
DOKTOR

Program Studi Doktor MIPA  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2026**

**Judul Disertasi** : **Identifikasi Bakteri Patogen Berbasis Metagenomik *New Generation Sequencing Oxford Nanopore Technologies (NGS-ONT)* Sebagai Model Pemeriksaan Sepsis Awitan Dini Bayi Prematur Di Rumah Sakit Abdoel Moeloek**

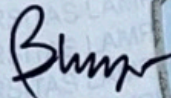
**Nama Mahasiswa** : **Ieni Ervina**  
**Nomor Pokok Mahasiswa** : **2337061005**  
**Program Studi** : **Doktor MIPA**  
**Fakultas** : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**  
**Bidang Minat** : **Neonatologi**

**MENYETUJUI**

**1. Komisi Promotor**

Promotor,

Ko-Promotor 1

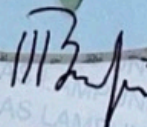


**Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed.**  
NIP. 195901011987031001



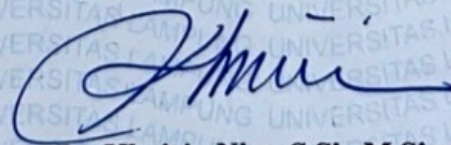
**Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, M.Kes., AIFO.**  
NIP. 197402262001121002

Ko-Promotor 2



**Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.**  
NIP. 196503031992031006

**2. Ketua Program Studi Doktor MIPA  
Universitas Lampung**



**Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197407262000032001

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dr.Eng.Heri Satria,S.SI.,M.SI**

**Sekretaris : Dr.Khoirin Nisa,S.Si.,M.Si.**

**Promotor : Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed.**

**Ko-Promotor 1 : Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, M.Kes., AIFO.**

**Ko-Promotor 2 : Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.**

**Penguji Internal : Dr. dr. Syazili Mustofa, M.Biomed.**

**Penguji Eksternal : Dr. dr. Prambudi Rukmono, Sp.A.,  
Subsp.Neo (K), M.M.Rs.**

**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Dr. Eng. Heri Satria, S.SI., M.SI.**  
NIP. 197110012005011002

**Tanggal Lulus Ujian Disertasi : 3 Juni 2026**

*Heri Satria*

*Khoirin Nisa*

*Hendri Busman*

*Khairun Nisa Berawi*

*Bambang Irawan*

*Syazili Mustofa*

*Prambudi Rukmono*

*Heri Satria*



## DAFTAR LUARAN PENELITIAN YANG DIHASILKAN

### 1. PUBLIKASI

<b>Keterangan</b>	<b>Uraian</b>
Jenis Dokumen	Artikel Jurnal
Judul Artikel	<i>Limitation of Blood Culture and the Emerging Role of Metagenomic Next Generation Sequencing in Early – Onset Neonatal Sepsis among Premature Infants</i>
Nama Penulis	Leni Ervina, Hendri Busman, Khairun Nisa Berawi, Bambang Irawan, Syazili Mustofa
Corresponding Author	Leni Ervina
Nama Jurnal	Scopus Q4
Tanggal LoA	25 Februari 2026
Status Naskah	Accepted for Publication
Publikasi	Vol. 21 No. 2, 15 Maret 2026
Penerbit	Zenodo – Revista Latinoamericana de Hipertension (Latin American Journal of Hypertension)
Indeksasi Jurnal	Scopus Q4

## 2. PUBLIKASI

<b>Keterangan</b>	<b>Uraian</b>
Jenis Dokumen	Artikel Jurnal
Judul Artikel	<i>Bacterial Patterns and Antibiotic Sensitivity Among Neonatal Sepsis Patients in Dr. H. Abdul Moeloek Hospital, Lampung</i>
Nama Penulis	Leni Ervina, Hendri Busman, Khairun Nisa Berawi, Bambang Irawan, Nailul Azizah, Jennifer Ester Yolanda
Corresponding Author	Leni Ervina
Nama Jurnal	Paediatrica Indonesiana
Status Naskah	Accepted for Publication
Publikasi	Vol. 65 No. 4, 29 Agustus 2025
Penerbit	Paediatrica Indonesiana
Indeksasi Jurnal	Paediatrica Indonesiana

**3. HKI**  
**HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL (HKI)**

<b>Keterangan</b>	<b>Uraian</b>
Judul HKI	Identifikasi Bakteri Patogen Berbasis Metagenomik NGS-ONT Sebagai Model Pemeriksaan Sepsis Awitan Dini Bayi Prematur di Rumah Sakit Abdoel Moeloek
Jenis HKI	Hak Cipta
Jenis Ciptaan	Karya Tulis (Disertasi)
Nomor Permohonan	EC002026065313
Nomor Pencatatan	001233142
Tanggal Permohonan	15 Mei 2026
Tanggal Pencatatan	Tahun 2026
Pencipta	Leni Ervina, Hendri Busman
Pemegang Hak Cipta	Leni Ervina, Hendri Busman
Instansi Penerbit	Direktorat Jendral Kekayaan Intelektual, Kementerian Hukum Republik Indonesia

## LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Disertasi dengan judul “Identifikasi Bakteri Patogen Berbasis Metagenomik *New Generation Sequencing Oxford Nanopore Technologies (NGS-ONT)* Sebagai Model Pemeriksaan Sepsis Awitan Dini Bayi Prematur Di Rumah Sakit Abdoel Moelock” Adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam Masyarakat akademik atau yang disebut plagiarism.
2. Hal intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Juni 2026  
Pembuat Pernyataan



**Leni Ervina**

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Krui pada tanggal 8 April 1980 dari pasangan Drs. Hi. M. Khottob dan Hj. Yusnaini Khottob. Penulis merupakan anak pertama dari empat bersaudara.

Pada tahun 1992 penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 1 Puralaksana, Way Tenong, Lampung. Selanjutnya, pada tahun 1995 penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 1 Fajar Bulan. Pada tahun 1998 penulis lulus dari Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 2 Bandar Lampung. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung dan memperoleh gelar dokter pada tahun 2005.

Pada tahun 2010 penulis melanjutkan pendidikan Program Dokter Spesialis Anak di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya dan memperoleh gelar Spesialis Anak (Sp-1) pada tahun 2014. Selanjutnya, pada tahun 2016 penulis melanjutkan pendidikan Program Dokter Subspesialis Konsultan Neonatologi (Sp-2) di Universitas Indonesia dan menyelesaikan pendidikan konsultan pada tahun 2018. Pada tahun 2023 penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang doktoral pada Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.

Saat ini penulis bekerja di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek pada bagian Perinatologi. Selain itu, penulis juga aktif sebagai dokter klinis yang membimbing dokter muda/koas Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sejak tahun 2018 hingga sekarang.

Karya ini penulis persembahkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala, Tuhan Yang Maha Suci dan Maha Tinggi. Semoga Allah meridhai karya ini, menjadikannya amal jariyah yang bernilai pahala, serta menjadi jalan untuk memperoleh ilmu yang bermanfaat, rezeki yang baik, dan amal saleh yang diterima di sisi-Nya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillah rabbil'alamin. Segala puji hanya bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala, Tuhan semesta alam, Yang Maha Suci lagi Maha Tinggi, yang tiada sesembahan yang berhak disembah dengan benar selain Dia. Berkat kasih sayang, nikmat, dan keridhaan-Nya, penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala senantiasa melimpahkan keselamatan dan kesejahteraan kepada Rasulullah Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat beliau.

Sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur adalah sindrom klinis yang ditandai dengan perubahan hemodinamik dan manifestasi klinis lainnya. Kondisi ini diakibatkan karena adanya investasi bakteri pada cairan tubuh yang terjadi pada bayi baru lahir kurang dari 72 jam yang paling sering didapatkan secara vertikal dari ibu. Baku emas penegakan diagnosis sepsis neonatorum adalah kultur darah. Tetapi, pemeriksaan kultur darah membutuhkan waktu lama dan berisiko mendapat hasil negatif palsu. Pemeriksaan berbasis molekuler seperti analisa metagenomik berbasis Next-Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology (NGS-ONT) yang merupakan NGS generasi ketiga memiliki akurasi lebih tinggi dan waktu pemeriksaan lebih cepat, sehingga dapat menjadi pemeriksaan model baku emas pemeriksaan untuk menegakan diagnosis sepsis neonatorum. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan model baku emas dalam diagnosis sepsis neonatorum awitan dini, khususnya di Provinsi Lampung.

Kemudian, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pimpinan Universitas Lampung, Ibu Rektor, Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM, ASEAN Eng, beserta jajaran.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., beserta jajaran.
3. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Lampung, Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., beserta jajaran.

4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Ibu Dr. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc., beserta jajaran.
5. Ketua Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, Dr. Khoririn Nisa, S.Si., M.Si., dan Dosen-Dosen di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, beserta Staf Akademik. Terima kasih atas bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis dari awal perkuliahan hingga saat ini.
6. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed, selaku dosen pembimbing akademik. Beliau adalah guru penulis, yang banyak sekali memberikan nasihat, arahan, motivasi dan teladan bagi penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, ilmudan semangat yang diberikan kepada penulis dari awal masuk menjadi dosen Unila, dan kemudian dari awal studi sampai dengan penyelesaian studi di Program Doktor MIPA Universitas Lampung. Penulis masih tetap membutuhkan arahan dan nasihat dari beliau dalam dunia akademik sampai sekarang.
7. Bapak Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed, selaku pembimbing disertasi dan promotor. Beliau adalah guru penulis, yang banyak sekali teladan bagi penulis. Terima kasih atas kasih dan sayang, perhatian, semangat dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis dari awal perkuliahan hingga saat ini. Penulis masih tetap akan membutuhkan contoh dan arahan dari beliau di bidang akademik sampai saat ini.
8. Ibu Dr. dr. Khairun Nisa Berawi., M.Kes., selaku pembimbing disertasi dan ko promotor. Beliau adalah pembimbing yang memberikan banyak contoh teladan yang bisa diambil dalam dunia akademik. Terima kasih atas motivasi, arahan, bimbingan, kasih sayang, saran, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis.
9. Bapak Prof. Dr. Bambang Irawan., M.Sc., selaku pembimbing disertasi dan ko promotor. Beliau adalah pembimbing yang selalu memotivasi bimbingannya untuk terus bersemangat dan bekerja dengan tekun. Terima kasih atas arahan, motivasi, bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dibagi kepada penulis dari awal penulis menjadi dosen hingga saat ini.

10. Bapak Dr. dr. Syazili Mustofa, M.Biomed, selaku penguji dan pembahas. Terima kasih atas segala masukan, bimbingan, arahan, dukungan moril maupun materil, serta ilmu dan saran yang sangat berharga.
11. Bapak Dr. dr. Prambudi Rukmono, Sp.A(K), M.M.RS selaku penguji dan pembahas. Terima kasih atas segala masukan, bimbingan, arahan, dukungan moril maupun materil, serta ilmu dan saran yang sangat berharga.
12. Bapak Wawan Abdullah Setiawan, M.Si. Terima kasih atas keridhoan, kerja keras, masukan, bantuan, dan kerjasama yang sangat baik sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik.
13. Direktur RSUD Abdul Moeloek, dr. Imam Ghozali Sp.An., KMN., M.Kes.
14. Teman-teman SMF Anak RSUD Abdul Moeloek.
15. Teman-teman mahasiswa Program Studi Doktor MIPA angkatan 2023.
16. Kedua orang tua tercinta, (Alm) Drs. Hi. M. Khottob dan Hj. Yumnaini Khottob. Terima kasih atas kasih sayang yang telah diberikan, doa dan harapan semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala membalasnya. Dan kepada adik-adik tersayang, Irawan Topani, SH. MKn., Apdiansyah SH., MH. dan Iip Nurul Topani, SH., MH. Terima kasih atas kasih sayang dan perhatian yang telah diberikan.
17. Suami tercinta, Anca Martha Utama Nawawi, SSTP., M.M., M.P., dan anak tercinta R.Fathan Rajendra Vinanca. Terima kasih atas cinta, kasih sayang, waktu, tenaga, semangat, motivasi, pengorbanan dan rasa tenang yang telah diberikan kepada penulis.
18. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Allah Subhanahu wa ta'ala membalas kebaikan Bapak, Ibu dan Saudara dengan balasan yang lebih baik. Aamiin.

Bandar Lampung, 06 Mei 2026

Leni Ervina

**IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN BERBASIS METAGENOMIK  
NGS-ONT SEBAGAI MODEL PEMERIKSAAN SEPSIS AWITAN DINI  
BAYI PREMATUR DI RUMAH SAKIT ABDOEL MOELOEK**

**ABSTRAK**

**Oleh  
Leni Ervina**

**Latar belakang :** Sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur adalah sindrom klinis yang ditandai dengan perubahan hemodinamik dan manifestasi klinis lainnya. Kondisi ini diakibatkan karena adanya investasi bakteri pada cairan tubuh yang terjadi pada bayi baru lahir kurang dari 72 jam yang paling sering didapatkan secara vertikal dari ibu. Baku emas penegakan diagnosis sepsis neonatorum adalah kultur darah. Tetapi, pemeriksaan kultur darah membutuhkan waktu lama dan berisiko mendapat hasil negatif palsu. Pemeriksaan berbasis molekuler seperti **analisa metagenomik berbasis *Next-Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology* (NGS-ONT)** yang merupakan NGS generasi ketiga memiliki akurasi lebih tinggi dan waktu pemeriksaan lebih cepat, sehingga dapat menjadi pemeriksaan model baku emas pemeriksaan untuk menegakan diagnosis sepsis neonatorum.

**Tujuan :** Mengidentifikasi bakteri patogen penyebab sepsis neonatus awitan dini dengan pemeriksaan metagenomik berbasis NGS-ONT sebagai model baku emas dibandingkan dengan pemeriksaan kultur darah.

**Metode :** Penelitian analisis observasional dengan metode potong lintang untuk mengidentifikasi bakteri patogen penyebab sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur berbasis analisa metagenomik NGS-ONT dibandingkan dengan kultur darah. Spesimen diambil dari jaringan darah segar tali pusat bayi bayu lahir prematur.

**Hasil :** Karakteristik subjek menunjukkan bahwa proporsi jenis kelamin pada pasien sepsis neonatorum awitan dini relatif seimbang antara laki-laki (53,3%) dan perempuan (46,7%), serta tidak ada perbedaan bermakna dibandingkan bayi sehat ( $p = 0,193$ ). Berat badan lahir pada kelompok sepsis neonatorum awitan dini secara signifikan lebih rendah dibandingkan bayi sehat, masing-masing dengan median 1.411 g (rentang 800–2.200 g) dan 2.406 g (2.000–3.200 g) ( $p < 0,001$ ). Selain itu, skor APGAR menit ke-1 dan ke-5 pada kelompok sepsis juga secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok bayi sehat ( $p < 0,001$ ). Seluruh kultur darah pada kedua kelompok dilaporkan steril. Pemeriksaan NGS-ONT tidak mendeteksi bakteri pada bayi prematur sehat, sedangkan pada kelompok sepsis teridentifikasi 10 spesies bakteri dengan keberlimpahan tertinggi dengan 5 spesies terbanyak yaitu: *Cutibacterium acnes*, *Ectopseudomonas guguanensis*, *Janibacter massiliensis*, *Moraxella osloensis*, *Paracoccus marcusii*. Evaluasi efektivitas diagnostik metode molekuler dilakukan menggunakan analisis komparatif proporsi dengan *Fisher's Exact Test* ( $p < 0,001$ ) yang menunjukkan bahwa pemeriksaan NGS-ONT memiliki potensi kemampuan deteksi patogen yang secara signifikan lebih tajam dan sensitif dalam membedakan kondisi infeksi pada neonatus dibandingkan dengan metode kultur darah konvensional.

**Simpulan :** Pemeriksaan NGS-ONT mampu mengidentifikasi bakteri pada bayi prematur dengan sepsis awitan dini meskipun seluruh hasil kultur darah sebagai baku emas menunjukkan hasil steril. Ini menjadi proyeksi model deteksi bakteri penyebab sepsis awitan dini untuk meningkatkan akurasi terapi yang diberikan.

**Kata kunci:** sepsis neonatorum awitan dini, bayi prematur, analisis metagenomik, NGS-ONT, NGS generasi ketiga, kultur darah, bakteri patogen

**METAGENOMIC-BASED IDENTIFICATION OF PATHOGENIC  
BACTERISM USING NGS-ONT AS AN  
MODEL FOR EARLY-ONSET SEPSIS DIAGNOSIS IN PRETERM  
INFANTS AT ABDOEL MOELOEK HOSPITAL**

**ABSTRACT**

**By**

**Leni Ervina**

**Background:** Early-onset neonatal sepsis in preterm infants is a clinical syndrome characterized by hemodynamic instability and other clinical manifestations. This condition results from the invasion of microorganisms into body fluids occurring within the first 72 hours of life, most commonly acquired vertically from the mother. The gold standard for diagnosing neonatal sepsis is blood culture. However, blood culture requires a prolonged processing time and carries a risk of false-negative results. Molecular-based diagnostic methods, such as metagenomic analysis using Next Generation Sequencing–Oxford Nanopore Technology (NGS-ONT) as a third-generation NGS, offer higher accuracy and faster turnaround time, making them a potential gold standard for the diagnosis of neonatal sepsis.

**Objective:** To identify pathogenic microorganisms causing early-onset neonatal sepsis using third-generation NGS-ONT-based metagenomic analysis as an gold standard compared to blood culture.

**Methods:** This study employed an observational analytical design with a cross-sectional approach to identify pathogenic microorganisms responsible for early-onset neonatal sepsis in preterm infants using NGS-ONT based metagenomic analysis, compared with blood culture. Specimens were obtained from fresh umbilical cord blood of preterm neonates.

**Results:** The subject characteristics showed that the sex distribution among patients with early-onset neonatal sepsis was relatively balanced between males (53.3%) and females (46.7%), with no significant difference compared to healthy neonates ( $p = 0.193$ ). Birth weight in the early-onset neonatal sepsis group was significantly lower than in healthy neonates, with median values of 1,411 g (range 800–2,200 g) and 2,406 g (range 2,000–3,200 g), respectively ( $p < 0.001$ ). Additionally, the 1-minute and 5-minute APGAR scores in the sepsis group were significantly lower than those in the healthy group ( $p < 0.001$ ). All blood culture results in both groups were reported as sterile. NGS-ONT examination did not detect microorganisms in healthy preterm infants, whereas in the sepsis group, 10 bacterial species with the highest relative abundance were identified, with the most 5 species including: *Cutibacterium acnes*, *Ectopseudomonas guguanensis*, *Janibacter massiliensis*, *Moraxella osloensis*, *Paracoccus marcusii*. Evaluation of the diagnostic effectiveness of the molecular method was performed using comparative proportion analysis with Fisher's Exact Test ( $p < 0.001$ ), which demonstrated that NGS-ONT examination has the potential for significantly higher and more sensitive pathogen detection capability in distinguishing infectious conditions in neonates compared with conventional blood culture methods.

**Conclusion:** NGS-ONT examination is capable of identifying microorganisms in preterm infants with early-onset sepsis, despite all blood culture results being sterile. This finding suggests its potential as a model for detecting causative microorganisms of early-onset sepsis, thereby improving the accuracy of therapeutic interventions.

**Keywords:** early-onset neonatal sepsis, premature infants, metagenomic analysis, NGS-ONT, third-generation NGS, blood culture, pathogenic bacteria

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b>	xi
<b>DAFTAR TABEL</b>	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	xvi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b>	xvii
<b>BAB 1</b>	1
<b>PENDAHULUAN</b>	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	7
1.5 <i>Novelty</i> Penelitian .....	7
1.6 Hipotesis Penelitian .....	8
1.7 Kerangka Konseptual Penelitian .....	8
1.8 Penelitian Terdahulu .....	9
<b>BAB 2</b>	13
<b>TINJAUAN PUSTAKA</b>	13
2.1 Sepsis Neonatus Awitan Dini .....	13
2.1.1 Definisi .....	13
2.1.2 Epidemiologi .....	13
2.1.3 Klasifikasi .....	14
2.1.4 Etiologi .....	14
2.1.5 Faktor Risiko .....	15
2.1.6 Diagnosis .....	17
2.1.7 Pemeriksaan Penunjang .....	17
2.2 Prematuritas .....	17
2.2.1 Definisi .....	17
2.2.2 Faktor Risiko .....	18
2.2.3 Prematur dan Sepsis Neonatus Awitan Dini .....	18
2.3 Identifikasi Bakteri Berbasis <i>Next-Generation Sequencing</i> <i>Oxford Nanopore Technology</i> (NGS-ONT).....	20

2.3.1 Ekstraksi DNA.....	21
2.3.2 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA.....	22
2.3.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	23
2.3.4 Elektroforesis.....	24
2.3.5 Analisis Metagenomik .....	26
2.3.6 <i>Next Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology</i> (NGS-ONT).....	29
2.4 Ringkasan Perbandingan Metode Identifikasi bakteri Berbasis Kultur Darah dan Metagenomik (NGS-ONT) terhadap Diagnosa Sepsis Neonatorum Awitan Dini.....	37
<b>BAB 3</b>	41
<b>METODE PENELITIAN</b>	41
3.1 Jenis Penelitian .....	41
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	41
3.2.1 Tempat Penelitian .....	41
3.2.2 Waktu Penelitian .....	41
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian .....	41
3.4 Persetujuan Etik .....	43
3.5 Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional .....	43
3.5.1 Variabel Bebas dan Terikat .....	43
3.5.2 Definisi Operasional Penelitian .....	43
3.6 Bahan, Alat dan Prosedur Penelitian .....	44
3.6.1 Penegakan Kecurigaan Klinis Sepsis .....	44
3.6.2 Pengujian berbasis kultur darah.....	45
3.6.3 Analisis NGS.....	46
3.7 Proses Analisis Data .....	57
3.8 Alur Penelitian .....	58
<b>BAB 4</b>	61
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	61
4.1 Hasil.....	61
4.1.1 Karakteristik Sampel Penelitian.....	61
4.1.2 Identifikasi Bakteri Patogen dari Hasil Kultur Bayi Prematur	

Sehat dan Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	63
4.1.3 Identifikasi Bakteri Patogen Berbasis Analisis Metagenomik NGS-ONT pada Bayi Prematur Sehat dan Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	63
4.1.4 Analisis potensi identifikasi bakteri patogen berbasis analisis metagenomik NGS-ONT sebagai model pemeriksaan dibandingkan metode kultur darah standar dalam penentuan etiologi sepsis awitan dini pada bayi prematur.....	84
4.2 Pembahasan.....	87
4.2.1 Karakteristik Sampel Penelitian.....	87
4.2.2 Identifikasi Bakteri Patogen dari Hasil Kultur Bayi Prematur Sehat dan Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	88
4.2.3 Identifikasi Bakteri Patogen Berbasis Analisis Metagenomik NGS-ONT pada Bayi Prematur Sehat dan Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	91
4.2.4 Analisis potensi identifikasi bakteri patogen berbasis analisis metagenomik NGS-ONT sebagai model pemeriksaan dibandingkan metode kultur darah standar dalam penentuan etiologi sepsis awitan dini pada bayi prematur.....	108
<b>BAB 5</b>	110
<b>SIMPULAN DAN SARAN</b>	110
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	112
<b>LAMPIRAN</b>	129

## DAFTAR TABEL

1. Daftar penelitian terdahulu.....	10
2. Perbandingan keberhasilan deteksi bakteri berbasis metode kultur darah dengan NGS pada berbagai penelitian.....	12
3. Faktor Risiko Maternal dan Indikator Klinis pada Neonatus.....	16
4. Distribusi Etiologi Sepsis Neonatorum Awitan Dini Berdasarkan Studi Epidemiologi.....	19
5. Perbedaan teknologi sekuensing generasi pertama, kedua, dan ketiga	31
6. Perbandingan Metode Identifikasi bakteri Berbasis Kultur Darah dan NGS-ONT terhadap Diagnosa Sepsis Neonatorum Awitan Dini.....	38
7. Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	43
8. Bahan-Bahan Reaksi PCR.....	51
9. Pengaturan <i>Thermocycle</i> .....	52
10. Tahapan Pemeriksaan NGS-ONT.....	57
11. Karakteristik Sampel Penelitian.....	61
12. Hasil Kultur Darah Bayi Prematur Sehat dan Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	63
13. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Bayi Sehat....	64
14. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Bayi Sepsis. Awitan Dini.....	65
15. Analisis Univariat Perbandingan Konsentrasi dan Kemurnian DNA sampel Bayi Prematur dengan Sepsis Awitan Dini.....	66
16. Uji Normalitas Konsentrasi DNA.....	68
17. Uji Normalitas Kemurnian DNA.....	68
18. Uji Homogenitas <i>Varians Levene</i> .....	68
19. Uji <i>Mann-Whitney U</i> .....	69
20. Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR Gen 16s rRNA.....	70
21. Hasil Pemeriksaan Kualitas Sampel.....	72
22. Keputusan hasil pemeriksaan kualitas berdasarkan hasil elektroforesis	74
23. Komposisi 10 spesies bakteri terbanyak pada sampel S1 (N1195-1)	76
24. Komposisi 10 spesies bakteri terbanyak pada sampel S2 (N1195-2)	78

25. Komposisi 10 spesies bakteri terbanyak pada sampel S3 (N1195-3)	80
26. Top 10 taxa–species sampel S1, S2, dan S3.....	83
27. Rekapitulasi Hasil Kultur Darah dan Hasil PCR Bayi Prematur Sehat	84
28. Rekapitulasi Hasil Kultur Darah dan Hasil PCR Bayi Prematur dengan SNAD.....	85
29. Hasil Analisis <i>Fisher's Exact Test</i> .....	86

## DAFTAR GAMBAR

1. Kerangka Konsep Penelitian .....	8
2. Diagram Alur Ekstraksi DNA.....	22
3. Perkembangan Teknologi Sekuensing .....	30
4. Perhitungan Besar Sampel.....	42
5. Diagram Alur Tahapan Pemeriksaan NGS-ONT.....	57
6. Alur Penelitian.....	58
7. Diagram Alur Pemeriksaan NGS-ONT.....	59
8. Hasil Pemeriksaan Kualitas Sampel dengan Elektroforesis Gel Agarosa oleh PT. Genetika Science.....	73
9. Diagram <i>sunburst</i> komposisi keragaman sampel S1 (N1195-1).....	75
10. 10 spesies bakteri terbanyak pada sampel S1 (N1195-1).....	76
11. Diagram <i>sunburst</i> komposisi keragaman relatif sampel S2 (N1195-2)	77
12. 10 spesies bakteri terbanyak pada sampel S2 (N1195-2).....	78
13. Diagram <i>sunburst</i> komposisi keragaman relatif sampel S3 (N1195-3)	79
14. 10 Spesies bakteri terbanyak pada sampel S3 (N1195-3).....	81
15. Ilustrasi hubungan antar sampel dalam bentuk diagram Venn.....	82
16. Grafik Top 10 <i>taxa-species</i> sampel S1, S2, dan S3.....	83
17. <i>Plot Principal Coordinate Analysis</i> (PCoA) .....	99

## DAFTAR SINGKATAN

AFA	: <i>Adaptive Focused Acoustics</i>
AMR	: <i>Anti Microbial Resistance</i>
APGAR	: <i>Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration</i>
BBLR	: <i>Bayi Berat Lahir Rendah</i>
BBLSR	: <i>Bayi Berat Lahir Sangat Rendah</i>
BBLASR	: <i>Bayi Berat Lahir Amat Sangat Rendah</i>
CoNS	: <i>Coagulase-negative Staphylococci</i>
DIC	: <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
dNTP	: <i>Deoksiribosa Nukleotida</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GBS	: <i>Group B Streptococcus</i>
HICs	: <i>High Income Countries</i>
ITS	: <i>Internal Transcribed Spacer</i>
IUGR	: <i>Intrauterin Growth Restriction</i>
KPD	: <i>Ketuban Pecah Dini</i>
LMICs	: <i>Low Middle Income Countries</i>
mNGS	: <i>Metagenomic Next-Generation Sequencing</i>
NGS	: <i>Next Generation Sequencing</i>
NGS-ONT	: <i>Next Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology</i>
NICU	: <i>Neonatal Intensive Care Unit</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PICU	: <i>Pediatric Intensive Care Unit</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SIRS	: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SNAD	: <i>Sepsis Neonatorum Awitan Dini</i>
WES	: <i>Whole Exome Sequencing</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Sepsis neonatal merupakan infeksi sistemik yang terjadi pada bayi dalam 28 hari pertama kehidupan dan merupakan salah satu penyebab utama morbiditas serta mortalitas pada bayi baru lahir di seluruh dunia. Kondisi ini berkaitan dengan sistem imun neonatus yang masih belum matang sehingga bayi lebih rentan terhadap infeksi. Sepsis neonatal diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu *early-onset sepsis* (EOS) yang muncul dalam 72 jam pertama kehidupan dan umumnya ditularkan dari ibu selama kehamilan atau persalinan, serta *late-onset sepsis* (LOS) yang terjadi setelah 72 jam kehidupan dan biasanya berasal dari lingkungan rumah sakit atau komunitas. Secara global, sepsis neonatorum masih menjadi masalah kesehatan yang signifikan dengan insiden yang tinggi. WHO melaporkan angka kejadian sepsis neonatorum pada periode 1979 hingga Mei 2019 sebesar 2.824 kasus per 100.000 kelahiran hidup (Suwarna *et al.*, 2022).

Selain itu, secara global diperkirakan terdapat sekitar 3 juta kasus sepsis neonatorum setiap tahunnya dengan angka kematian sekitar 19% pada periode 1979–2016 (Fleischmann-Struzek *et al.*, 2018). Di kawasan Asia, insiden sepsis neonatorum dilaporkan berkisar antara 4–30 kasus per 1.000 kelahiran hidup dengan angka mortalitas antara 3–30% (Yadav *et al.*, 2018). Tingginya angka kejadian dan mortalitas tersebut menunjukkan bahwa sepsis neonatorum masih menjadi tantangan utama dalam pelayanan kesehatan perinatal, terutama di negara berkembang, serta berkontribusi besar terhadap morbiditas dan mortalitas neonatal secara global.

Secara klinis, sepsis neonatorum merupakan suatu sindrom sistemik yang terjadi akibat invasi bakteri patogen ke dalam aliran darah atau cairan tubuh steril lainnya pada bayi usia  $\leq 28$  hari, yang ditandai dengan perubahan hemodinamik dan manifestasi inflamasi sistemik. Infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, virus, maupun jamur, serta dapat bermanifestasi sebagai berbagai kondisi infeksi invasif seperti meningitis, pneumonia, artritis, osteomyelitis, dan infeksi saluran kemih (Procianoy & Silveira, 2020; Yadav *et al.*, 2018). Berdasarkan waktu awitan, sepsis neonatorum diklasifikasikan menjadi sepsis neonatorum awitan dini (*early-*

*onset sepsis*/EOS) yang terjadi dalam 48–72 jam pertama kehidupan dan sepsis neonatorum awitan lambat (*late-onset sepsis*/LOS) yang terjadi setelah 72 jam kehidupan (Procianoy & Silveira, 2020).

Perbedaan waktu awitan tersebut berhubungan erat dengan mekanisme transmisi dan etiologi bakteri penyebab infeksi. Sepsis neonatorum awitan dini umumnya terjadi akibat transmisi vertikal dari ibu ke bayi, baik melalui transmisi transplasenta maupun melalui kolonisasi bakteri selama proses persalinan, termasuk pada kondisi korioamnionitis atau infeksi intrauterin. Sebaliknya, sepsis neonatorum awitan lambat lebih sering disebabkan oleh transmisi horizontal dari lingkungan, termasuk tenaga kesehatan dan lingkungan perawatan neonatus (Glaser *et al.*, 2021). Meskipun demikian, kolonisasi bakteri akibat transmisi vertikal tetap dapat berkontribusi terhadap kejadian sepsis awitan lambat, menunjukkan kompleksitas patogenesis infeksi neonatal.

Secara etiologis, spektrum bakteri penyebab sepsis neonatorum awitan dini (SNAD) sangat beragam dan bervariasi tergantung pada usia gestasi dan kondisi klinis neonatus. Pada negara maju, *Group B Streptococcus* (GBS) dan *Escherichia coli* merupakan penyebab utama sepsis neonatorum awitan dini. Dalam sebuah studi kohort besar yang melibatkan lebih dari 200.000 bayi baru lahir, *Escherichia coli* dilaporkan sebagai patogen tersering dengan proporsi sekitar 36,6%, diikuti oleh *Group B Streptococcus* sebesar 30,2%. Infeksi *E. coli* lebih sering terjadi pada bayi prematur, sedangkan infeksi GBS lebih banyak ditemukan pada bayi aterm (Stoll *et al.*, 2020). Studi lain melaporkan sepuluh bakteri tersering penyebab sepsis neonatorum awitan dini, yaitu *Escherichia coli* (46,5%), *Group B Streptococcus* (18,8%), *Haemophilus* spp. (7,8%), *Staphylococcus aureus* (6,3%), *Klebsiella* spp. (4%), *Enterococcus* spp. (2,8%), *Streptococcus anginosus* (1,7%), *Listeria monocytogenes* (1,6%), *Enterobacter* spp. (1,4%), dan *Streptococcus pneumoniae* (1,3%) (Flannery *et al.*, 2021). Variasi etiologi tersebut menunjukkan kompleksitas spektrum patogen penyebab sepsis neonatorum serta menegaskan pentingnya metode diagnostik yang mampu mengidentifikasi bakteri secara komprehensif.

Bayi prematur merupakan kelompok yang memiliki risiko tinggi mengalami sepsis neonatorum, terutama sepsis awitan dini, akibat imaturitas sistem imun,

rendahnya transfer antibodi maternal, serta meningkatnya kerentanan terhadap invasi bakteri patogen. Selain itu, faktor risiko maternal seperti ketuban pecah dini, infeksi intrauterin, dan korioamnionitis juga berkontribusi terhadap peningkatan risiko sepsis pada neonatus prematur. Kondisi ini menyebabkan bayi prematur memiliki risiko morbiditas dan mortalitas yang lebih tinggi dibandingkan bayi cukup bulan (Ocviyanti & Wahono, 2018), sehingga memerlukan pendekatan diagnostik yang cepat dan akurat untuk menentukan etiologi infeksi secara tepat.

Hingga saat ini, kultur darah masih dianggap sebagai baku emas dalam diagnosis etiologi bakteri penyebab sepsis neonatorum (Yadav *et al.*, 2018). Namun demikian, metode kultur darah memiliki berbagai keterbatasan, antara lain sensitivitas yang terbatas, waktu pemeriksaan yang relatif lama, serta potensi hasil negatif palsu, sehingga hasil kultur negatif tidak dapat sepenuhnya mengeksklusi diagnosis sepsis neonatorum (Vasilescu *et al.*, 2025). Selain itu, hasil kultur darah sering dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti volume sampel yang terbatas, paparan antibiotik sebelumnya, dan kondisi klinis neonatus. Meskipun hasil kultur darah menjadi dasar dalam penentuan terapi antibiotik definitif, dalam praktik klinis antibiotik empiris tetap diberikan berdasarkan pola kuman rumah sakit sebagai bagian dari tata laksana sepsis neonatorum (Cantey & Baird, 2017).

Keterbatasan metode kultur darah tercermin dari rendahnya proporsi hasil kultur positif pada neonatus dengan kecurigaan klinis sepsis. Angka kultur darah positif pada sepsis neonatal sangat rendah, bahkan hanya sekitar 9% pada beberapa studi, sehingga banyak kasus neonatal sepsis bersifat *culture-negative* (De Rose *et al.*, 2024). Hasil yang sejalan juga dilaporkan di berbagai negara lain, seperti Bangladesh (34,88%), Uganda (37%), Ethiopia (44,7%), dan Nigeria (45,9%), serta di negara-negara Eropa dan Amerika yang menunjukkan rasio kultur positif dibandingkan negatif berkisar antara 1:6 hingga 1:16 (Klingenberg *et al.*, 2020). Di Indonesia, proporsi kultur positif pada pasien dengan diagnosis klinis sepsis neonatorum dilaporkan berkisar antara 42,6% hingga 50% (Salsabila *et al.*, 2022; Utomo *et al.*, 2021), sementara penelitian di Palembang menunjukkan bahwa sebanyak 44% neonatus dengan gejala klinis sepsis memiliki hasil kultur darah negatif (Karmila *et al.*, 2022).

Rendahnya tingkat positivitas kultur darah menunjukkan adanya potensi keterlambatan dalam penegakan diagnosis, yang dapat berdampak fatal hingga menyebabkan kematian. Keterlambatan diagnosis ini selanjutnya berimplikasi pada keterlambatan penanganan, yang pada akhirnya meningkatkan risiko mortalitas, bahkan dilaporkan bahwa setiap keterlambatan satu jam dapat meningkatkan risiko kematian (Coggins & Glaser, 2022). Kondisi ini menegaskan bahwa ketergantungan pada kultur darah sebagai satu-satunya metode diagnostik masih berpotensi menyebabkan keterlambatan maupun ketidakakuratan dalam mengidentifikasi etiologi infeksi. Selain itu, keterbatasan tersebut juga berpotensi mendorong penggunaan antibiotik empiris secara luas, yang berpotensi meningkatkan risiko resistensi antimikroba serta menghasilkan luaran klinis yang kurang optimal (Klingenberg *et al.*, 2020).

Perkembangan teknologi biologi molekuler memberikan peluang untuk meningkatkan akurasi diagnostik melalui pendekatan berbasis analisis metagenomik. Analisis metagenomik memungkinkan identifikasi langsung DNA bakteri dari sampel klinis tanpa memerlukan proses kultur dan tanpa memerlukan informasi sekuens gen sebelumnya. Metode ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, masing-masing mencapai sekitar 98,6%, serta mampu mendeteksi berbagai bakteri secara simultan, termasuk bakteri yang sulit atau tidak dapat dikultur, dan membedakan infeksi sejati dari kontaminasi (Brenner *et al.*, 2025). Implementasi teknologi *Next Generation Sequencing* (NGS) dalam analisis metagenomik telah merevolusi diagnostik penyakit infeksi dengan memungkinkan identifikasi simultan berbagai jenis bakteri, termasuk bakteri, virus, dan jamur, melalui pendekatan sekuensing gen 16S rRNA, 18S rRNA, *Internal Transcribed Spacer* (ITS), maupun pendekatan *shotgun* metagenomik (Wensel *et al.*, 2022). Metode berbasis gen 16S rRNA secara khusus dikenal sebagai metode yang cepat, andal, dan efektif dalam mendeteksi bakteri yang tidak dapat dikultur menggunakan metode konvensional (Tourelle *et al.*, 2021). Dengan demikian, teknologi NGS berbasis metagenomik memberikan keunggulan signifikan dalam meningkatkan sensitivitas dan cakupan identifikasi patogen, sehingga berpotensi mengatasi keterbatasan diagnostik berbasis kultur dalam penegakan etiologi infeksi secara lebih akurat dan komprehensif.

Perkembangan lebih lanjut menuju teknologi terbaru analisa metagenomik menggunakan *Next-Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology* (NGS-ONT) memberikan keunggulan tambahan berupa kemampuan membaca fragmen DNA dengan panjang yang lebih besar, analisis secara real-time, serta kemampuan mendeteksi modifikasi DNA secara langsung (Agudelo-Pérez *et al.*, 2023). Teknologi metagenomik NGS-ONT, telah menunjukkan kemampuan dalam mendeteksi bakteri patogen yang tidak teridentifikasi melalui metode kultur darah konvensional, termasuk bakteri yang sulit tumbuh atau terdapat dalam jumlah rendah (Yang *et al.*, 2023). Studi (Overbeek *et al.*, 2024) menunjukkan bahwa bakteri seperti *Cloacibacterium normanense*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterobacter cloacae*, dan *Enterococcus faecium* dapat diidentifikasi menggunakan NGS meskipun hasil kultur darah negatif.

Meskipun teknologi metagenomik NGS-ONT menunjukkan potensi yang besar dalam meningkatkan akurasi diagnostik infeksi, pemanfaatannya sebagai model baku emas dalam diagnosis sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur masih sangat terbatas, khususnya di Indonesia dan wilayah Provinsi Lampung. Hingga saat ini, belum terdapat penelitian yang secara khusus mengevaluasi akurasi dan potensi analisis metagenomik berbasis NGS-ONT dalam mengidentifikasi bakteri patogen penyebab sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur dibandingkan dengan metode kultur darah konvensional.

Berdasarkan uraian tersebut, terdapat kesenjangan antara kebutuhan akan metode diagnostik yang cepat, akurat, dan komprehensif dalam penegakan etiologi sepsis neonatorum awitan dini dengan keterbatasan metode kultur darah konvensional. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dan membandingkan akurasi identifikasi bakteri penyebab sepsis neonatorum pada bayi prematur menggunakan analisis metagenomik NGS-ONT dengan pemeriksaan kultur darah konvensional. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan model baku emas dalam diagnosis sepsis neonatorum awitan dini, khususnya di Provinsi Lampung, sehingga penegakan diagnosis dan pemberian terapi yang tepat dapat dilakukan secara lebih cepat, akurat, dan rasional, serta berkontribusi dalam menurunkan morbiditas dan mortalitas neonatus prematur.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dirumuskan masalah yang diteliti dalam penelitian ini yaitu :

1. Bagaimana karakteristik bayi prematur sehat dengan bayi prematur sepsis awitan dini?
2. Bakteri apa saja yang dapat diidentifikasi berdasarkan hasil pemeriksaan kultur darah pada bayi prematur sehat dibandingkan dengan kultur darah bayi prematur dengan sepsis awitan dini?
3. Bakteri apa saja yang dapat diidentifikasi berdasarkan analisis metagenomik menggunakan teknologi NGS-ONT pada bayi prematur sehat dibandingkan dengan bayi prematur dengan sepsis awitan dini?
4. Bagaimana potensi analisis metagenomik berbasis NGS-ONT sebagai model pemeriksaan dibandingkan metode kultur darah standar dalam penentuan etiologi bakteri patogen penyebab sepsis awitan dini pada bayi prematur?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan permasalahan di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi karakteristik bayi prematur sehat dengan bayi prematur awitan dini.
2. Mengidentifikasi perbedaan bakteri apa saja berdasarkan hasil pemeriksaan kultur darah pada bayi prematur sehat dibandingkan dengan kultur darah bayi prematur dengan sepsis awitan dini.
3. Mengidentifikasi bakteri apa saja berdasarkan analisis metagenomik menggunakan teknologi NGS-ONT pada bayi prematur sehat dibandingkan dengan bayi prematur dengan sepsis awitan dini.
4. Menganalisis potensi identifikasi bakteri patogen berbasis analisis metagenomik NGS-ONT sebagai model pemeriksaan dibandingkan metode kultur darah standar dalam penentuan etiologi sepsis awitan dini pada bayi prematur.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam berbagai aspek, seperti:

1. Manfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan terutama berkaitan dengan ilmu neonatologi berkaitan dengan pengembangan pemeriksaan untuk diagnosa dini bakteri patogen penyebab sepsis awitan dini pada bayi prematur.

2. Manfaat untuk pembuat kebijakan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan kepada pihak terkait, termasuk kementerian kesehatan, organisasi profesi dan rumah sakit untuk pengembangan model baku emas untuk diagnosa dini bakteri patogen penyebab sepsis awitan dini pada bayi prematur sebagai upaya penurunan tingkat morbiditas dan mortalitas.

3. Manfaat untuk praktisi

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat pada klinisi dalam mempertimbangkan modalitas pemeriksaan baru untuk penegakan etiologi sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur untuk dapat menentukan terapi definitif yang lebih cepat dan tepat dengan tata laksana yang sesuai untuk kondisi pasien.

#### 1.5. Novelty penelitian

*Novelty* atau kebaruan yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah pengembangan model pemeriksaan melalui pemanfaatan teknologi analisis metagenomik berbasis *Next Generation Sequencing-Oxford Nanopore Technology* (NGS-ONT) untuk mendukung penegakan diagnosis sepsis neonatorum awitan dini pada bayi prematur di Indonesia. Pemanfaatan teknologi ini diharapkan dapat dikembangkan sebagai modalitas diagnostik yang aplikatif dalam praktik klinis di Indonesia, serta berpotensi mengatasi keterbatasan metode kultur darah konvensional, khususnya terkait risiko hasil negatif palsu dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk memperoleh hasil pemeriksaan.

## 1.6 Hipotesis Penelitian

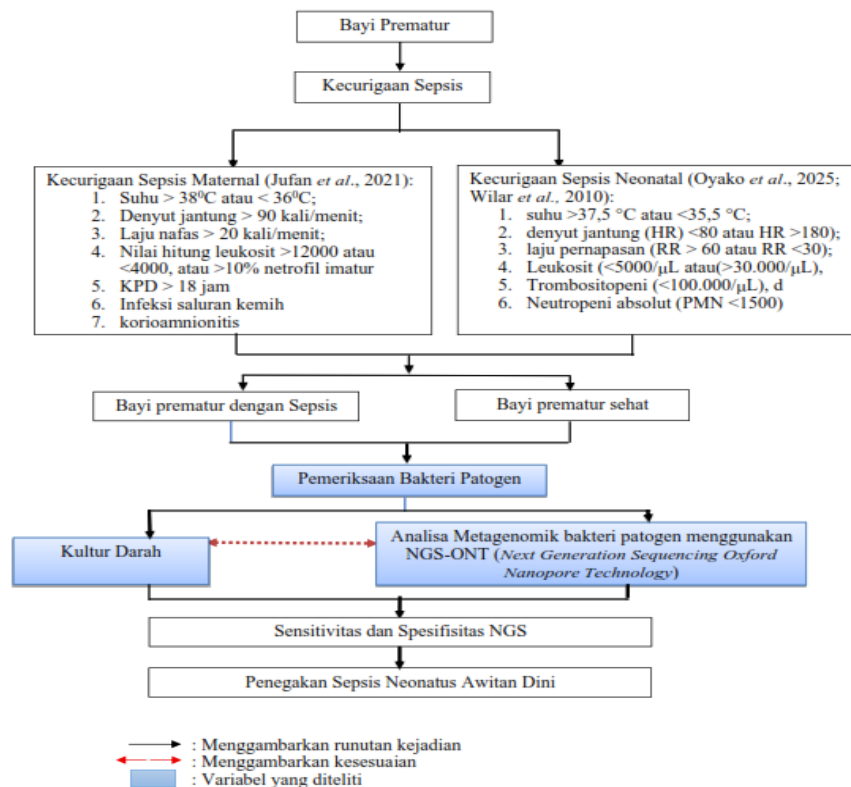
Identifikasi bakteri patogen berbasis analisis metagenomik dengan *Next Generation Sequencing Oxford Nanopore Technology* (NGS-ONT) lebih akurat dibandingkan pemeriksaan dengan kultur darah dalam mengidentifikasi bakteri patogen pada kasus sepsis awitan dini pasien bayi prematur.

H<sub>0</sub>: Analisis metagenomik NGS-ONT memiliki kemampuan deteksi bakteri patogen yang sama atau lebih rendah dibandingkan kultur darah pada sepsis neonatorum awitan dini bayi prematur.

H<sub>1</sub>: Analisis metagenomik NGS-ONT memiliki kemampuan deteksi bakteri patogen yang berbeda atau lebih tinggi dibandingkan kultur darah pada sepsis neonatorum awitan dini bayi prematur.

## 1.7 Kerangka Konseptual Penelitian

Secara skematis, kerangka konseptual dapat dilihat pada (**Gambar 1**) berikut:



**Gambar 1.** Kerangka Konseptual Penelitian

Bayi prematur memiliki risiko yang lebih tinggi untuk mengalami infeksi akibat imaturitas sistem imun serta berbagai faktor klinis yang menyertai kondisi prematuritas. Infeksi pada kelompok ini dapat berkembang secara cepat dan meluas hingga menimbulkan bakteremia, yaitu kondisi ketika bakteri memasuki dan beredar dalam aliran darah. Apabila bakteremia tersebut disertai dengan respons inflamasi sistemik dan gangguan fungsi organ, maka secara klinis kondisi tersebut dapat mengarah pada kecurigaan sepsis. Dalam praktik klinis, penegakan diagnosis sepsis tidak hanya didasarkan pada manifestasi klinis, tetapi juga memerlukan identifikasi etiologi bakteri patogen secara akurat agar dapat diberikan tata laksana yang tepat dan rasional. Hingga saat ini, pemeriksaan kultur darah masih dianggap sebagai baku emas dalam penegakan etiologi penyebab sepsis neonatorum. Namun demikian, metode ini memiliki sejumlah keterbatasan penting, antara lain waktu pemeriksaan yang relatif lama serta tingginya angka kultur negatif, terutama pada kondisi dengan jumlah bakteri yang rendah atau pada pasien yang telah menerima terapi antibiotik sebelumnya. Oleh karena itu, pengembangan pendekatan diagnostik berbasis analisis genetik bakteri termasuk bakteri menjadi sangat relevan untuk meningkatkan sensitivitas dan kecepatan deteksi patogen. Pendekatan ini diharapkan tidak hanya melengkapi metode kultur konvensional, tetapi juga memberikan dasar diagnostik yang lebih kuat dalam penentuan etiologi serta pengambilan keputusan klinis pada kasus sepsis neonatorum.

## **1.8 Penelitian Terdahulu**

Penelitian terdahulu yang dapat menjadi acuan pada penelitian ini yang mendukung hipotesis bahwa NGS-ONT dapat menjadi pemeriksaan sepsis awitan dini disajikan dalam daftar pada **Tabel 1** sebagai berikut :

**Tabel 1.** Daftar penelitian terdahulu

No	Peneliti (tahun)	Judul	Tujuan	Metode	Populasi	Hasil
1	Xiao-guang Cao, Shu-sheng Zhou, Chun-yan Wang, Kui Jin dan Hua-dong Meng (2022)	<i>The diagnostic value of NGS technology in sepsis</i>	Mengetahui kegunaan klinis NGS untuk diagnosis sepsis	Pemeriksaan NGS dilakukan pemeriksaan PCR dan disekuensing dengan BGISEQ-50/MGISEQ 2000 platform	Pasien dengan kecurigaan klinis sepsis dengan SOFA $\geq 2$ , dirawat di ICU dengan infeksi yang sulit ditentukan asalnya	Pemeriksaan NGS menunjukkan sensitivitas 95,16% dan spesifisitas 76,19% dengan diagnosis klinis sepsis. Nilai PPV NGS adalah 92,19% dan NPV 84,21%. (Cao <i>et al.</i> , 2022)
2	Yi Wu, Weiming Gong, Zhenni Wang, Mengjie Luo (2024)	<i>Identification of novel bacterial species in the blood of patients with neonatal sepsis</i>	Mengetahui bakteri patogen penyebab pada neonatus dengan gejala sepsis	PCR dilakukan dengan Sanger sequencing	Bayi berusia 0 hingga 28 hari dengan kecurigaan klinis sepsis dengan bayi tidak sakit sebagai kontrol	Dibandingkan dengan kultur, positive rate NGS adalah 44% (kultur 0%) dan negative rate NGS 56% (kultur 100%) (Wu <i>et al.</i> , 2014)
3	Gangfeng Yan, Jing Liu, Weiming Chen, Yang Chen, Ye Cheng, Jinhao Tao, Xiaodi Cai, Yang Zhou, Yixue Wang, Mingbang Wang, Guoping Lu (2021)	<i>Metagenomic Next-Generation Sequencing of Bloodstream Microbial Cell-Free Nucleic Acid in Children With Suspected Sepsis in Pediatric Intensive Care Unit</i>	Mengetahui manfaat metagenomik NGS pada pasien suspek sepsis di PICU	Pemeriksaan sekuensing dengan BGISEQ-50	Pasien di atas 28 hari dengan diagnosis klinis SIRS	Pasien dengan diagnosis klinis HAP menunjukkan jumlah bakteremia lebih besar dibandingkan dengan CAP. Pasien dengan imunodefisiensi menunjukkan jumlah spesies jamur dan protozoa yang lebih banyak. Serum inflamasi PCT secara positif berkorelasi signifikan

						dengan bakterimia (D. Yan <i>et al.</i> , 2024)
4	Lu Chen, Yujuan Zhao, Jiakai Wei, Wendi Huang, Ying Ma, Xuefeng Yang, Yang Liu, Jing Wang, Han Xia, Zheng Lou (2022)	<i>Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Neonatal Infectious Diseases</i>	Mengetahui kegunaan mNGS dari cell-free DNA pada penyakit infeksi neonatus yang berasal dari beberapa sediaan	Pemeriksaan mNGS dengan quantitative PCR (qPCR), PCR, atau Sanger sequencing	Neonatus dengan kecurigaan klinis infeksi	Pada pemeriksaan cairan tubuh, pemeriksaan NGS menunjukkan koinsidens rate 68,3%. Positivity rate pemeriksaan NGS adalah 70,2% (Chen <i>et al.</i> , 2022)
5	Sun, L., Zhang, S., Yang, Z., Yang, F., Wang, Z., Li, H., Li, Y., & Sun, T. (2022)	<i>Clinical Application and Influencing Factor Analysis of Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in ICU Patients With Sepsis.</i>	Untuk menganalisis aplikasi klinis dari mNGS pada pasien dengan sepsis di unit perawatan intensif (ICU).	Pemeriksaan mNGS	199 pasien sepsis barta yang dirawat di ICU	mNGS memiliki kelebihan tingkat positif yang cepat dan tinggi dalam mendeteksi patogen pada pasien dengan sepsis berat dengan tingkat positif mNGS lebih tinggi dibandingkan kultur darah (67,74% vs. 19,35%) (Sun <i>et al.</i> , 2022)
6	Yan, G., Liu, J., Chen, W., Chen, Y., Cheng, Y., Tao, J., Cai, X., Zhou, Y.,	<i>Metagenomic Next-Generation Sequencing of Bloodstream Microbial Cell-Free Nucleic</i>	Untuk mengidentifikasi mikrobioma aliran darah anak-anak dengan sepsis di unit perawatan intensif	Pemeriksaan NGS dilakukan pemeriksaan PCR dan disekuensing dengan BGISEQ-50 (MGI Technology,	Pasien anak yang didiagnosis dengan sindrom respons inflamasi sistemik (SIRS) dengan	Dibandingkan kultur darah, mNGS tidak hanya dapat mendeteksi infeksi oleh bakteri prokariotik, seperti bakteri dan virus,

Wang, Y., Wang, M., & Lu, G. (2021).	<i>Acid in Children With Suspected Sepsis in Pediatric Intensive Care Unit.</i>	pediatrik (PICU) menggunakan mNGS	Shenzhen, China)	mengacu pada kriteria diagnostik sepsis internasional	tetapi juga infeksi oleh organisme eukariotik.(G. Yan <i>et al.</i> , 2021)
--------------------------------------	---	-----------------------------------	------------------	---	---

**Tabel 2.** Perbandingan keberhasilan deteksi bakteri berbasis metode kultur darah dengan NGS pada berbagai penelitian

No	Keberhasilan Deteksi berbasis Kultur Darah	Keberhasilan Deteksi berbasis NGS	Sumber
1.	1,20 % (1/83)	61,45 % (51/83)	(Cao <i>et al.</i> , 2022)
2.	0% (0/45)	44% (20/45)	(Wu <i>et al.</i> , 2014)
3.	25,53 % (12/47)	89,36% (42/47)	(Chen <i>et al.</i> , 2022)
4.	13,13 % (13/99)	65,66 % (65/99)	(Zhou <i>et al.</i> , 2023)
5.	20,7 % (62/300)	68,0 % (204/300)	(Ma <i>et al.</i> , 2025)
6.	19,35% (24/124)	67,74% (84/124)	(Sun <i>et al.</i> , 2022)
7.	12,0% (6/50)	72,0% (36/50)	(Y. Liu <i>et al.</i> , 2025)
8.	59,1 % (75/127)	86,6 (110/127)	(Yu <i>et al.</i> , 2025)
9.	18.9% (7/37)	67.6 % (25/37)	(Qi <i>et al.</i> , 2023)
10.	19,4 % (95/491)	70,5 % (346/491)	(Brenner <i>et al.</i> , 2025)

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sepsis Neonatorum Awitan Dini

#### 2.1.1 Definisi

Sepsis merupakan sindrom klinik dari adanya disfungsi organ akibat respon tubuh terhadap suatu infeksi yang ditandai dengan adanya bakteremia. Sepsis itu sendiri dibagi menjadi sepsis yaitu bayi dengan faktor risiko atau ditemukan adanya sepsis selama perawatan, terlepas dari ada tidaknya gejala klinis, selanjutnya sepsis klinis yaitu adanya temuan klinis dan laboratorium, namun tidak adanya bakteri penyebab dan terakhir sepsis yang terbukti yaitu terdapat temuan klinis dan laboratorium, dan demonstrasi bakteri patogen dalam kultur yang diambil dari sampel steril (Kariniotaki *et al.*, 2025).

#### 2.1.2 Epidemiologi

Sepsis neonatorum awitan dini merupakan penyebab utama kematian bayi prematur. Hal ini disebabkan kondisi neonatus yang masih rentan dan imatur sehingga rentan terhadap berbagai faktor yang berisiko (Suwarna *et al.*, 2022). Berdasarkan penelitian oleh *Global Burden of Disease* tahun 2016/2017 kejadian sepsis neonatorum di dunia berkisar 1,3 juta kasus per tahun (Fleischmann-Struzek *et al.*, 2018). Di negara maju, kejadian sepsis neonatorum adalah 2-6 per 1000 kelahiran hidup, sedangkan di negara berkembang, angka kematian akibat sepsis neonatal berkisar antara 11-68/1000 kelahiran hidup (Utomo *et al.*, 2021).

Angka kejadian SNAD pada bayi yang lahir antara usia kehamilan 22 minggu dan 28 minggu berkisar 18,47/1000 kelahiran hidup dan pada bayi cukup bulan yaitu 0,5/1000 kelahiran hidup (Salsabila *et al.*, 2022). Populasi neonatus khususnya bayi berat lahir sangat rendah (BBLSR) dan bayi berat lahir amat sangat rendah (BBLASR) lebih rentan mengalami sepsis neonatal terutama karena sistem kekebalan tubuhnya yang belum matang (Sharma *et al.*, 2024). Indonesia belum mempunyai data mengenai kejadian sepsis, namun penelitian yang dilakukan di tiga rumah sakit di Indonesia menunjukkan SNAD lebih

sering terjadi pada bayi yang sangat prematur sebesar 29,2% dan pada bayi berat lahir sangat rendah (BBLSR) sebanyak 37,9% (Salsabila *et al.*, 2022).

### 2.1.3 Klasifikasi

Sepsis neonatorum merupakan infeksi sistemik yang terjadi pada 28 hari kehidupan pertama. Kondisi ini dapat dibedakan menjadi sepsis neonatus awitan dini (SNAD) yaitu sepsis yang terjadi dalam 72 jam pertama kehidupan dan sepsis neonatus awitan lanjut (SNAL) yang terjadi setelah usia 72 jam. Pada bayi baru lahir dengan sepsis awitan dini, 85% muncul dalam waktu 24 jam (median usia timbulnya sepsis 6 jam), 5% muncul dalam 24-48 jam, dan persentase lebih kecil muncul dalam 48-72 jam. Onset paling cepat terjadi pada neonatus prematur (Suwarna *et al.*, 2022).

### 2.1.4 Etiologi

Sumber infeksi yang menyebabkan SNAD berasal dari transplasenta ataupun perinatal sedangkan SNAL merupakan infeksi yang didapat setelah kelahiran ataupun infeksi nasokomial (Procianoy & Silveira, 2020). SNAD dikaitkan dengan penyebaran bakteri dari ibu. Infeksi dapat terjadi melalui penyebaran hematogen dan transplasental dari ibu yang terinfeksi atau, yang lebih umum, melalui infeksi dari leher rahim. Organisme yang menghuni saluran genitourinari ibu dapat menular ke neonatus saat melewati jalan lahir saat melahirkan (Fleischmann-Struzek *et al.*, 2018).

Bakteri gram positif terbanyak yang menyebabkan sepsis pada neonatus adalah *Coagulase-negative staphylococci* (CoNS), terutama *Staphylococcus epidermidis* sedangkan pada bakteri gram negatif yang terbanyak ialah *Klebsiella pneumoniae* (Singh *et al.*, 2022). Bakteri yang paling sering dikaitkan dengan SNAD adalah *Group B Streptococcus* (GBS), *Escherichia coli*, *Coagulase-negative staphylococci*, *Haemophilus influenzae* dan *Listeria monocytogenes* (Berardi *et al.*, 2019). Penyebab SNAD yang paling umum di negara-negara berpenghasilan tinggi/ *High-Income Countries* (HICs) adalah *Group B Streptococcus* (GBS) dan *E. coli*, sedangkan di *Low Middle Income Countries* (LMICs), SNAD mungkin didominasi oleh bakteri gram negatif,

dengan organisme ini dikaitkan dengan morbiditas yang lebih signifikan dan mortalitas yang lebih tinggi (Salsabila *et al.*, 2022).

Penelitian yang dilakukan (Ji *et al.*, 2022) yang melibatkan 108 kasus SNAD (18,4 per 1000 pasien masuk) melaporkan insiden SNAD meningkat seiring dengan penurunan usia gestasi dan berat lahir. *Escherichia coli* ditemukan sebanyak 40,7% dan merupakan patogen yang paling umum, diikuti oleh *Klebsiella spp.* sebanyak 9,3%. Distribusi dan proporsi bakteri patogen bervariasi secara signifikan berdasarkan usia gestasi. *E.coli* dan *Klebsiella spp.* menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap ampisilin dan sefalosporin generasi ketiga, namun menunjukkan kerentanan yang baik terhadap antibiotik karbapenem dan piperacillin-tazobactam (Salsabila *et al.*, 2022).

Kandidat patogen spesifik dari kelompok anaerob oral yang terkait dengan infeksi pada bayi dengan kelahiran prematur adalah *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, dan *Prevotella*. Bakteri tersebut ditemukan secara spesifik lebih banyak di dalam darah tali pusat (Vander Haar *et al.*, 2022). Tali pusat yang mengalami devitalisasi menyediakan media ideal untuk pertumbuhan bakteri. Sumber bakteri yang berpotensi patogen menghuni tali pusat antara lain jalan lahir ibu dan berbagai sumber bakteri lokal di lokasi persalinan, yang paling menonjol adalah tangan tidak steril yang berasal dari individu yang membantu persalinan (Stewart *et al.*, 2016). Dengan menggunakan metode kultur independen, bakteri yang teridentifikasi di tali pusat pada pasien SNAD pada bayi prematur sebanyak 18 spesies (7 non-redundan). Spesies baru yang diidentifikasi paling umum adalah *E. coli* dan *Fusobacterium nucleatum*. Mengingat prevalensinya pada sepsis neonatus awitan dini, *F. Nucleatum* harus ditempatkan pada skala kepentingan yang sama dengan *E. coli* (Salsabila *et al.*, 2022).

### **2.1.5 Faktor Risiko**

Faktor risiko yang berhubungan terhadap kejadian sepsis neonatorum meliputi faktor maternal dan faktor bayi. Faktor maternal meliputi ketuban pecah dini, demam selama kehamilan, dan ketuban hijau. Faktor bayi yang memengaruhi sepsis neonatorum antara lain bayi berat lahir rendah (BBLR),

APGAR *score*, dan usia gestasi. Prematuritas menjadi salah satu faktor yang memiliki risiko kesakitan dan kematian yang tinggi untuk terjadinya sepsis neonatorum (Amanda Jaya *et al.*, 2019).

Peningkatan kerentanan terhadap infeksi pada bayi prematur terutama disebabkan oleh defisiensi sistem imun, terutama karena penurunan antibodi IgG dan aktivasi komplemen yang tidak kompeten, epitel yang belum matang serta meningkatnya kebutuhan akan alat invasif (akses vaskular, selang endotrakeal, selang makanan dan kateter saluran kemih) (Anastasia, 2017). Studi menunjukkan bahwa prematuritas dan BBLR berhubungan signifikan dengan kejadian sepsis neonatorum pada pasien NICU (Nuhan & Mirawati, 2025).

Beberapa faktor risiko serta indikator klinis yang dapat digunakan untuk mencurigai adanya sepsis pada neonatus ditunjukkan oleh **Tabel 3** sebagai berikut (NICE Guidelines, 2021):

**Tabel 3.** Faktor Risiko Maternal dan Indikator Klinis pada Neonatus

Faktor Risiko Maternal	Indikator Klinis pada Neonatus
<p><b>Tanda Bahaya</b> atau konfirmasi infeksi pada bayi lain jika terjadi kehamilan ganda.</p>	<p><b>Tanda Bahaya</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apnea (berhentinya pernapasan sementara)</li> <li>• Kejang</li> <li>• Kebutuhan akan resusitasi jantung paru</li> <li>• Kebutuhan akan ventilasi mekanis</li> <li>• Tanda-tanda syok</li> </ul>
<p><b>Faktor risiko lainnya:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infeksi streptokokus grup B invasif pada bayi atau ibu yang pernah mengalami kolonisasi streptokokus grup B, bakteriuria, atau infeksi pada kehamilan saat ini.</li> <li>• Kelahiran prematur setelah persalinan spontan sebelum usia kehamilan 37 minggu.</li> <li>• Dikonfirmasi pecah ketuban lebih dari 18 jam sebelum kelahiran prematur.</li> <li>• Dikonfirmasi adanya ketuban pecah sebelum persalinan cukup bulan selama lebih dari 24 jam sebelum permulaan persalinan.</li> <li>• Demam intrapartum lebih tinggi dari 38°C jika dicurigai atau dipastikan adanya infeksi bakteri.</li> <li>• Diagnosis klinis korioamnionitis.</li> </ul>	<p><b>Indikator klinis lainnya:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perubahan kebiasaan atau tingkah laku</li> <li>• Perubahan tonus otot</li> <li>• Kesulitan dan Intoleransi makan, termasuk muntah, aspirasi lambung dan distensi abdomen berlebihan</li> <li>• Denyut jantung tidak normal (bradikardia atau takikardia)</li> <li>• Tanda-tanda gangguan pernapasan (termasuk nafas cuping hidung, retraksi, takipnea)</li> <li>• Hipoksia (misalnya, sianosis sentral atau penurunan tingkat saturasi oksigen)</li> <li>• Hipertensi pulmonal persisten pada bayi baru lahir</li> <li>• Penyakit kuning dalam waktu 24 jam setelah kelahiran</li> <li>• Tanda-tanda <i>ensefalopati neonatal</i></li> <li>• Kelainan suhu (lebih rendah dari 36°C atau lebih tinggi dari 38°C) yang tidak</li> </ul>

	<p>dapat dijelaskan oleh faktor lingkungan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perdarahan berlebihan, trombositopenia, atau koagulasi abnormal yang tidak diketahui penyebabnya</li> <li>• Perubahan homeostatis glukosa (hipoglikemia atau hiperglikemia)</li> <li>• Asidosis metabolik (defisit basa 10 mmol/liter atau lebih)</li> </ul>
--	--

### 2.1.6 Diagnosa

Tanda dan gejala yang muncul pada sepsis neonatorum tidaklah spesifik sehingga gambaran klinis yang tidak biasa dapat dicurigai kemungkinan adanya infeksi pada neonatus. Berbagai manifestasinya antara lain gangguan pernafasan, pneumonia, apnea, keterlambatan waktu pengisian kapiler, intoleransi makan, enterokolitis nekrotikans, ketidakstabilan suhu termasuk hipotermia dan hipertermia, hipotonia, kejang, ubun-ubun menonjol, *Disseminated Intravascular Coagulation* (DIC), manifestasi perdarahan, dan *jaundice* yang berkepanjangan (Anastasia, 2017)

Diagnosa sepsis awitan dini berdasarkan adanya gejala klinis seperti letargi, refleks hisap menurun, merintih, iritabel, kejang, gangguan gastrointestinal, gangguan respirasi, waktu pengosongan lambung memanjang (Kariniotaki *et al.*, 2025).

### 2.1.7 Pemeriksaan Penunjang

Kultur darah adalah standar diagnosa sepsis neonatal, pemeriksaan ini memiliki spesifisitas tinggi tetapi sensitivitas rendah untuk infeksi invasif (Anastasia, 2017).

## 2.2 Prematuritas

### 2.2.1 Definisi

Prematur didefinisikan sebagai bayi yang lahir hidup sebelum usia kehamilan 37 minggu. Terdapat subkategori kelahiran prematur berdasarkan usia kehamilan yaitu *extremely* prematur (kurang dari 28 minggu), sangat prematur (28 hingga kurang dari 32 minggu, dan prematur sedang hingga akhir (32 hingga 37 minggu) (Marsubrin *et al.*, 2023).

### 2.2.2 Faktor Risiko

Dua dari tiga kelahiran prematur terjadi secara spontan, sementara yang lain terjadi karena kondisi medis ibu atau komplikasi janin, seperti preeklamsia atau pembatasan pertumbuhan intrauterin (IUGR). Faktor risiko yang signifikan untuk kelahiran prematur termasuk usia ibu lanjut, tingkat pendidikan kehamilan, jumlah kelahiran, kehamilan kembar, perawatan prenatal minimal atau tidak sama sekali, dan jenis kelamin janin laki-laki (Ma *et al.*, 2025)

### 2.2.3 Prematur dan Sepsis Neonatus Awitan Dini

Meta-analisis dan tinjauan sistematis literatur menunjukkan bahwa prematuritas sering dilaporkan sebagai salah satu faktor risiko paling umum untuk sepsis awitan dini pada neonatus (Murthy *et al.*, 2019). Disfungsi sistem kekebalan tubuh, ketidakmatangan, serta kurangnya antibodi IgG ibu pada neonatus prematur berkontribusi terhadap peningkatan risiko infeksi. Sepsis neonatal awitan dini terjadi di dalam rahim baik melalui bakteri transplasental atau, yang lebih umum, bakteri ascending yang memasuki rahim dari lingkungan vagina setelah pecahnya selaput ketuban. Selain itu, bayi yang baru lahir mungkin terinfeksi ketika terkena bakteri, virus, atau jamur yang berpotensi patogen saat melewati jalan lahir (Shane *et al.*, 2017).

Korioamnionitis histologis dikaitkan dengan sepsis neonatal awitan dini pada bayi prematur (OR 5,88 (95% CI, 3,68–9,41)). Begitupula korioamnionitis klinis juga dikaitkan dengan sepsis neonatal awitan dini pada bayi prematur (OR = 3,90 (95% CI, 2,74–5,55)) (Beck *et al.*, 2021). Korioamnionitis, sering disebut sebagai infeksi intraamniotik, adalah peradangan akut pada selaput janin, yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Tingkat korioamnionitis histologis berbanding terbalik dengan usia kehamilan saat lahir dan berhubungan langsung dengan durasi pecahnya ketuban. Korioamnionitis terjadi akibat invasi mikroba pada cairan ketuban, seringkali akibat pecahnya membran korioamnion dalam waktu lama (Shane *et al.*, 2017).

Penelitian (Dornelles *et al.*, 2022) yang melibatkan 40 (48%) bayi prematur dengan diagnosis klinis sepsis neonatus awitan dini dan 44 (52%) bayi prematur sehat melaporkan bahwa mekonium pertama berbeda pada neonatus

prematurnya dengan dan tanpa sepsis awitan dini. Filum yang paling banyak terdeteksi pada kedua kelompok adalah *Proteobacteria*, dan bakteri ini lebih banyak ditemukan pada kelompok sepsis ( $p < 0,034$ ). Empat belas varian di antara komunitas bakteri ( $p < 0,001$ ) berkorelasi dengan sepsis neonatus awitan dini. Genera yang paling berkaitan erat dengan sepsis neonatus awitan dini adalah *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, dan *Alloprevotella* (Dornelles *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil kajian terhadap berbagai studi epidemiologi, diketahui bahwa etiologi sepsis neonatorum awitan dini menunjukkan variasi distribusi bakteri yang dipengaruhi oleh faktor geografis, karakteristik populasi, serta setting pelayanan kesehatan (Abdelrahman *et al.*, 2025). Secara umum, beberapa bakteri dilaporkan sebagai penyebab utama secara global, sementara penelitian lokal (khususnya Lampung) menunjukkan pola distribusi yang dapat berbeda. Oleh karena itu, untuk memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai bakteri penyebab sepsis neonatorum awitan dini, disajikan ringkasan hasil kajian dari berbagai penelitian sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 4** berikut.

**Tabel 4.** Distribusi Etiologi Sepsis Neonatorum Awitan Dini Berdasarkan Studi Epidemiologi

No	Bakteri	Persentase (%)	Sumber
1	<i>Escherichia coli</i>	36–46,5% (global); 3% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025; Flannery <i>et al.</i> , 2021; Stoll <i>et al.</i> , 2020)
2	<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	18,8–30,2%	(Flannery <i>et al.</i> , 2021; Stoll <i>et al.</i> , 2020)
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4–28% (global); 23% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025; Flannery <i>et al.</i> , 2021)
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,3–17,5% (global); 10% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025; Flannery <i>et al.</i> , 2021)
5	<i>Enterobacter spp. (E. cloacae)</i>	1,4–16,1% (global); 3% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025; Flannery <i>et al.</i> , 2021; Yu <i>et al.</i> , 2025)
6	<i>coagulase-negative Staphylococcus (CoNS)</i>	28.6% (global)	(Flannery <i>et al.</i> , 2021)

7	<i>Enterococcus spp.</i>	2,8% (global); 10% ( <i>E. faecium</i> ) (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025; Flannery <i>et al.</i> , 2021)
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025)
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025)
10	<i>Burkholderia cepacia</i>	19% (Lampung)	(Ervina <i>et al.</i> , 2025)

### 2.3. Identifikasi Bakteri Berbasis *Next-Generation Sequencing Oxford Nanopore Technology* (NGS-ONT)

Keterbatasan metode kultur konvensional dalam mengidentifikasi bakteri patogen, terutama pada kasus infeksi dengan jumlah mikroba rendah atau paparan antibiotik sebelumnya, telah mendorong pengembangan metode diagnostik berbasis molekuler yang lebih sensitif dan komprehensif. Pada kondisi seperti sepsis neonatorum, khususnya pada bayi prematur, hasil kultur darah sering kali negatif meskipun terdapat manifestasi klinis infeksi, sehingga menyulitkan penegakan diagnosis etiologis dan penentuan terapi yang tepat. Perkembangan teknologi berbasis analisis asam nukleat, termasuk *Next Generation Sequencing* (NGS), memungkinkan identifikasi bakteri secara langsung dari sampel klinis melalui analisis materi genetik mikroba tanpa bergantung pada proses kultur, sehingga meningkatkan sensitivitas dan cakupan deteksi patogen (Wensel *et al.*, 2022).

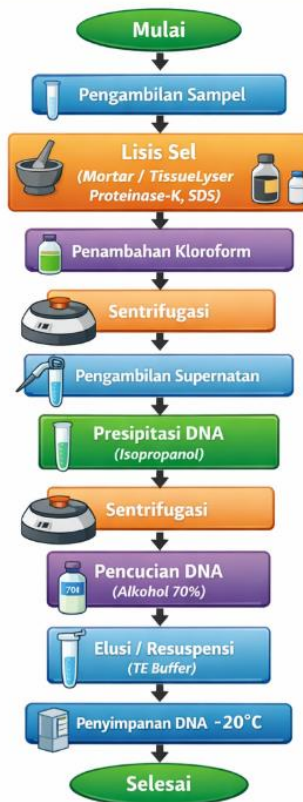
Lebih lanjut, teknologi sekuensing generasi ketiga seperti *Oxford Nanopore Technology* (ONT) menawarkan keunggulan berupa kemampuan pembacaan DNA secara real-time dan long reads, yang memungkinkan identifikasi bakteri secara lebih cepat, akurat, dan komprehensif, sehingga berpotensi meningkatkan akurasi diagnosis infeksi, termasuk pada kasus sepsis neonatorum dengan hasil kultur darah negatif (Jain *et al.*, 2018). Dengan demikian, pendekatan diagnostik berbasis analisis materi genetik menggunakan teknologi NGS, khususnya ONT, menjadi sangat penting dalam mendukung deteksi patogen secara dini dan tepat sebagai dasar pengelolaan infeksi yang lebih efektif.

### 2.3.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan teknik pemisahan DNA yang bertujuan untuk mendapatkan DNA murni. Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, mulai dari metode konvensional ataupun metode kit. Terdapat beberapa tahapan dalam proses ekstraksi DNA yaitu, pelisisan sel, purifikasi, presipitasi, dan elusi. Prinsip utama dalam proses ekstraksi DNA yaitu penghancuran membran sel atau organel - organel dengan tujuan memisahkan DNA dari bahan penyusun sel lain tanpa merusak DNA tersebut (Ariyanti & Sianturi, 2019). Proses lisis merupakan proses awal yang dijadikan penentu keberhasilan ekstraksi DNA. Beberapa cara dapat digunakan dalam tahapan lisis ini, diantaranya menggunakan Teknik kimiawi yaitu menggunakan enzim seperti proteinase-K dan SDS dan juga menggunakan teknik mekanik yaitu penggerusan menggunakan mortar atau menggunakan TissueLyser (Hariyadi *S et al.*, 2018).

Proses selanjutnya penambahan kloroform yang memiliki berat jenis lebih besar dari sampel sehingga membuat kloroform bergerak ke dasar tabung. Kloroform berfungsi untuk menghilangkan sisa – sisa dinding sel dari tahap lisis dan dapat mendenaturasi protein. Langkah berikutnya adalah memisahkan DNA dan protein dengan cara sentrifugasi. Pada tahap presipitasi supernatan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi isopropanol dengan volume yang sama dengan volume supernatan. Isopropanol bersifat fiksatif yaitu dapat menarik air atau mengondisikan dehidrasi yang membuat DNA terbentuk dan tidak mengendap. Selanjutnya tahapan purifikasi DNA menggunakan alkohol 70% dengan tujuan untuk mencuci dan mengendapkan DNA, setelah DNA mengendap diresuspensi dengan TE dan DNA dapat disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Ariyanti & Sianturi, 2019).

## Proses Ekstraksi DNA



**Gambar 2.** Diagram Alur Ekstraksi DNA (Novianti T., 2022)

### 2.3.2 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi merupakan parameter fundamental yang secara langsung memengaruhi efisiensi amplifikasi serta kualitas produk PCR yang dihasilkan (Rodríguez-Riveiro *et al.*, 2022). Oleh karena itu, tahap kuantifikasi dan evaluasi kemurnian DNA menjadi prosedur esensial sebelum analisis molekuler dilakukan. Pengukuran tersebut umumnya dilakukan menggunakan metode spektrofotometri yang didasarkan pada prinsip Hukum *Beer-Lambert*, yaitu hubungan linear antara absorbansi dan konsentrasi suatu senyawa dalam larutan. Pada panjang gelombang 260 nm, asam nukleat menunjukkan puncak serapan maksimum, sedangkan protein menyerap cahaya secara optimal pada panjang gelombang 280 nm (Li *et al.*, 2021). Dengan demikian, rasio absorbansi  $A_{260}/A_{280}$  digunakan sebagai indikator kemurnian DNA, di mana nilai pada kisaran 1,8–2,0 mengindikasikan

DNA dengan tingkat kemurnian yang baik dan relatif bebas dari kontaminasi protein (Rodríguez-Riveiro *et al.*, 2022).

Selain spektrofotometri, metode fluorometri juga banyak digunakan sebagai pendekatan kuantifikasi DNA yang lebih sensitif dan selektif. Teknik ini bekerja berdasarkan pengukuran intensitas fluoresensi yang dihasilkan dari interaksi spesifik antara pewarna fluoresen, seperti *PicoGreen*, dengan DNA untai ganda (*double-stranded DNA/dsDNA*) (Pentzold *et al.*, 2025). Keunggulan utama metode fluorometrik dibandingkan metode berbasis absorbansi terletak pada kemampuannya mendeteksi DNA pada konsentrasi sangat rendah serta meminimalkan interferensi dari kontaminan non-DNA. Namun demikian, metode ini tidak menyediakan informasi mengenai tingkat kemurnian DNA, seperti rasio A260/A280 maupun A260/A230, sehingga evaluasi kemurnian tetap memerlukan analisis berbasis spektrofotometri (Bruijns *et al.*, 2022).

### 2.3.3 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan teknik amplifikasi DNA yang digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA spesifik melalui sintesis DNA untai ganda menggunakan molekul DNA target sebagai cetakan dengan bantuan enzim DNA polimerase tahan panas. Keberhasilan PCR bergantung pada pengaturan siklus suhu yang presisi menggunakan *thermal cycler*, yang mengontrol tiga tahap utama, yaitu denaturasi pada sekitar 94°C untuk memisahkan DNA menjadi dua untai tunggal, annealing pada suhu 50–60°C untuk memungkinkan primer berikatan secara spesifik dengan urutan target, dan ekstensi pada suhu 72°C untuk sintesis untai DNA komplementer baru. Reaksi ini memerlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA template, sepasang primer spesifik, enzim DNA polimerase tahan panas seperti Taq atau Pfu, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), dan larutan buffer yang menjaga kondisi reaksi tetap optimal dengan menyediakan ion penting yang mendukung aktivitas enzim. Primer berperan penting dalam menentukan spesifisitas amplifikasi karena dirancang komplementer terhadap urutan DNA target, sehingga memungkinkan amplifikasi fragmen DNA tertentu secara selektif dan efisien. Oleh karena itu, teknik PCR digunakan dalam berbagai aplikasi biologi

molekuler, termasuk identifikasi bakteri melalui amplifikasi gen penanda molekuler tertentu (Wensel *et al.*, 2022).

Gen penanda molekuler yang paling umum digunakan untuk identifikasi bakteri adalah gen 16S rRNA, yang diamplifikasi menggunakan teknik PCR karena memiliki kombinasi daerah konservatif dan daerah variabel dalam urutannya. Daerah konservatif memungkinkan gen ini ditemukan pada hampir semua bakteri dan berfungsi sebagai target universal untuk pengikatan primer, sedangkan daerah variabel mengandung variasi urutan nukleotida yang memungkinkan pembedaan antar spesies dan strain bakteri. Gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1500 pasangan basa dan terdiri dari sembilan daerah variabel yang memberikan informasi taksonomi penting untuk identifikasi bakteri secara akurat. Variasi urutan nukleotida dalam gen ini memungkinkan analisis hubungan filogenetik dan identifikasi bakteri hingga tingkat spesies, sehingga sangat berguna dalam studi mikrobiologi molekuler. Dengan demikian, amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan PCR diikuti dengan analisis sekuensing telah menjadi metode standar dalam identifikasi dan karakterisasi bakteri karena memberikan resolusi taksonomi yang tinggi serta keandalan yang baik dalam berbagai aplikasi penelitian dan diagnostik mikrobiologi (Johnson *et al.*, 2019).

#### **2.3.4 Elektroforesis**

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan pergerakannya dalam medan listrik. Metode ini secara luas digunakan untuk keperluan preparatif maupun analitis, seperti pemisahan, pemurnian, dan karakterisasi asam nukleat (DNA dan RNA) serta protein. Teknik ini tergolong sederhana, cepat, dan sangat sensitif, di mana campuran molekul bermuatan dibiarkan bermigrasi menuju elektroda yang berlawanan di bawah pengaruh medan listrik, baik secara bebas maupun melalui medium pendukung seperti gel yang memiliki sifat penyaring. Selama proses migrasi, molekul bermuatan tersebut terpisah satu sama lain berdasarkan perbedaan ukuran, bentuk, dan muatannya (Rana & Joshi, 2023).

Elektroforesis gel agarosa merupakan teknik yang umum digunakan dalam biologi molekuler untuk memisahkan dan mengkarakterisasi asam nukleat berdasarkan migrasinya melalui matriks gel di bawah pengaruh medan listrik. Agarosa adalah polisakarida alami dari rumput laut yang memiliki kekuatan gel tinggi, tidak beracun, dan netral secara listrik, sehingga efektif sebagai media pemisahan DNA, meskipun kandungan gugus sulfat dapat memengaruhi kinerja gel dan dapat dikurangi melalui proses desulfasi untuk meningkatkan kualitas pemisahan (Zhang *et al.*, 2021). Dalam elektroforesis, DNA bermuatan negatif akan bergerak menuju elektroda positif, dan fragmen yang lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan fragmen yang lebih besar karena hambatan fisik dari pori-pori gel. Metode seperti SURE (*successive reloading electrophoresis*) meningkatkan sensitivitas dengan memuat sampel DNA encer secara berulang ke dalam sumur yang sama dan memberikan pulsa listrik singkat untuk menghasilkan stacking molekuler. Proses stacking ini memungkinkan DNA dari beberapa pemuatan terkonsentrasi dalam satu pita sempit dengan intensitas sinyal tinggi dan pelebaran minimal, sehingga hingga 97% DNA dapat terintegrasi dalam pita yang terbentuk. Dengan optimasi tegangan dan interval waktu serta kompatibilitas dengan buffer seperti TAE ataupun TBE, elektroforesis gel agarosa menjadi teknik yang sangat efektif untuk memisahkan, mendeteksi, dan menganalisis DNA bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah (Sowersby & Lewis, 2024).

Perkembangan teknologi elektroforesis modern telah meningkatkan efisiensi dan resolusi dalam analisis DNA, terutama melalui penggunaan *capillary electrophoresis* (CE) dan sistem berbasis mikrofluida. *Capillary electrophoresis* memungkinkan pemisahan fragmen DNA dalam kapiler sempit dengan efisiensi tinggi, waktu analisis yang lebih cepat, serta kemampuan otomatisasi. Teknologi ini sangat penting dalam analisis DNA modern karena memungkinkan pemisahan dan karakterisasi DNA dengan resolusi tinggi serta penggunaan volume sampel yang sangat kecil. Perkembangan CE terbaru mencakup peningkatan media pemisahan, sistem deteksi, dan metode pemisahan multidimensi untuk meningkatkan performa analisis DNA (Sowersby & Lewis, 2024).

Teknologi elektroforesis modern lainnya adalah *microchip electrophoresis* (MCE), yang merupakan pengembangan dari *capillary electrophoresis* berbasis sistem mikrofluida dan memungkinkan analisis DNA secara cepat, otomatis, serta menggunakan volume sampel yang sangat kecil. Teknologi ini memungkinkan pemisahan dan karakterisasi biomolekul secara efisien dalam skala mikro, sehingga sangat sesuai untuk aplikasi genomik modern dan diagnostik molekuler (Kašička, 2025). Selain itu, teknik elektroforesis modern juga mencakup *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), yaitu metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berukuran sangat besar dengan menerapkan medan listrik yang berubah arah secara periodik. Prinsip PFGE didasarkan pada kemampuan molekul DNA besar untuk mengalami reorientasi setiap kali arah medan listrik berubah, sehingga fragmen DNA dengan ukuran berbeda akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda melalui matriks gel dan terpisah secara efektif. Mekanisme ini memungkinkan pemisahan fragmen DNA genomik berukuran besar, termasuk kromosom utuh, yang tidak dapat dipisahkan menggunakan elektroforesis konvensional. Oleh karena itu, PFGE digunakan dalam DNA *fingerprinting*, *subtyping* bakteri, dan analisis genom karena kemampuannya menghasilkan pola pita DNA spesifik yang dapat digunakan untuk membedakan strain bakteri dan menganalisis hubungan genetiknya (Hicks *et al.*, 2018).

### **2.3.5 Analisa Metagenomik**

Analisis metagenomik merupakan pendekatan yang digunakan untuk mempelajari materi genetik bakteri secara langsung dari suatu sampel tanpa melalui proses kultur. Pendekatan ini didasarkan pada ekstraksi dan pengayaan seluruh DNA mikroba yang terdapat dalam sampel lingkungan atau klinis, sehingga memungkinkan eksplorasi keragaman genetik bakteri secara lebih luas. Hal ini menjadi penting karena pada metode kultur tradisional diperkirakan sekitar 99% bakteri di lingkungan tidak dapat dikultur di laboratorium (Agudelo-Pérez *et al.*, 2023). Dengan demikian, analisis metagenomik memungkinkan identifikasi dan eksplorasi gen yang sebelumnya tidak diketahui, terutama yang berasal dari bakteri yang tidak dapat tumbuh melalui metode kultur konvensional. Dalam

praktiknya, analisis metagenomik umumnya dilakukan dengan mengekstraksi DNA secara langsung dari sampel, kemudian menganalisisnya menggunakan gen target filogenetik, seperti gen 16S rRNA, yang berfungsi sebagai penanda molekuler untuk mengidentifikasi dan memperkirakan komposisi bakteri secara global dalam suatu komunitas (Wensel *et al.*, 2022).

Perkembangan teknologi metagenomik juga membuka peluang baru dalam eksplorasi potensi biologis bakteri, termasuk penemuan biokatalis yang sebelumnya belum dimanfaatkan dari mikroba yang tidak dapat dikultur di laboratorium. Untuk meningkatkan efisiensi proses penemuan tersebut, pendekatan metagenomik sering dikombinasikan dengan alat skrining *throughput* tinggi (*High Throughput Screening/HTS*). Dalam alur kerja ini, identifikasi gen yang mengkode biokatalis menjadi tahap penting untuk memperoleh urutan gen yang lengkap, salah satunya melalui teknologi *Next Generation Sequencing* (NGS). Teknologi NGS mampu mengatasi keterbatasan metode sekuensing konvensional yang memerlukan biaya tinggi dan waktu yang lama dengan cara memecah genom menjadi fragmen-fragmen kecil yang kemudian disekuensing secara paralel dan disusun kembali melalui proses bioinformatika (Wensel *et al.*, 2022). Selain itu, NGS berbasis analisis bioinformatika memungkinkan pengolahan data secara lebih efektif dan efisien, termasuk dalam proses anotasi genom, pemetaan genom, serta analisis lanjutan seperti identifikasi gen homolog dan interaksi antar gen yang terkait (Sun *et al.*, 2022).

Perkembangan *Next Generation Sequencing* (NGS) telah membawa perubahan besar dalam penelitian biomedis, khususnya di bidang mikrobiologi klinis. Teknologi ini memungkinkan analisis genom secara komprehensif, seperti melalui *Whole Genome Sequencing* (WGS), yang dapat dimanfaatkan untuk manajemen wabah, pengawasan patogen, penentuan subtipe bakteri, hingga pelacakan penularan zoonosis. Meskipun demikian, penerapan pendekatan sekuensing *high-throughput* yang tidak bergantung pada kultur masih terbatas pada beberapa laboratorium untuk tujuan diagnostik. Dari perspektif klinis, metagenomik klinis menunjukkan potensi yang besar karena mampu berfungsi sebagai satu jenis pengujian yang dapat digunakan secara simultan untuk tujuan diagnostik, penentuan subtipe patogen, deteksi resistensi antimikroba, serta

identifikasi faktor virulensi (Tourelle *et al.*, 2021). Pendekatan ini juga telah banyak digunakan untuk mempelajari dinamika populasi bakteri secara lebih sederhana dan efisien, serta memberikan gambaran resolusi tinggi mengenai interaksi bakteri dengan inang yang berperan dalam terjadinya penyakit (Cao *et al.*, 2022).

Pengurutan metagenomik memiliki kemampuan yang baik dalam mendeteksi patogen langka, patogen baru, maupun infeksi multipatogen, sehingga sangat bermanfaat pada pasien dengan kondisi sistem imun yang lemah, seperti bayi, anak-anak, lansia, atau pasien dengan penyakit dasar yang sering menjalani perawatan di rumah sakit. Pada kondisi tersebut, metode metagenomik memungkinkan deteksi patogen secara lebih dini, termasuk bakteri yang tidak dapat diidentifikasi menggunakan metode deteksi mikroba konvensional (Pendleton *et al.*, 2017). Beberapa penelitian juga menunjukkan keunggulan pendekatan ini dalam berbagai bidang. Penelitian oleh (Cernava *et al.*, 2019) menunjukkan bahwa analisis metagenomik yang dikombinasikan dengan pemeriksaan isolat mampu mengungkap berbagai mekanisme resistensi antibiotik pada mikrobioma yang sebelumnya belum teridentifikasi di habitat alaminya. Selain itu, penelitian oleh Chen *et al.* (2022) melaporkan bahwa pengurutan metagenomik pada diagnosis penyakit infeksi paru menghasilkan tingkat deteksi patogen yang lebih tinggi (56,25–92,31%) dibandingkan dengan uji mikrobiologi konvensional (27,27–64,29%), bahkan mampu mendeteksi patogen pada sampel yang sebelumnya dinyatakan negatif oleh pemeriksaan laboratorium tradisional (Pendleton *et al.*, 2017).

Perkembangan teknologi sekuensing DNA sendiri telah mengalami evolusi panjang sejak penemuan struktur tiga dimensi DNA oleh Watson dan Crick pada tahun 1953, yang kemudian diikuti dengan pengembangan metode pengurutan DNA generasi pertama dengan panjang pembacaan kurang dari 1 kb. Kemajuan selanjutnya menghasilkan teknologi pengurutan generasi berikutnya yang memanfaatkan pendekatan sintesis DNA berbasis deteksi pirofosfat melalui sistem enzimatik luminesen, sehingga memungkinkan analisis genom secara paralel dengan throughput yang lebih tinggi. Perkembangan ini kemudian mengarah pada teknologi sekuensing generasi ketiga, seperti *Single Molecule*

*Real-Time (SMRT) sequencing*, yang memungkinkan pengurutan molekul DNA tunggal tanpa proses amplifikasi sehingga dapat meminimalkan bias analisis. Salah satu inovasi penting pada generasi ini adalah teknologi *nanopore sequencing*, di mana molekul DNA atau RNA dapat dilewatkan melalui nanopori biologis untuk dibaca secara langsung. Teknologi ini kemudian dikembangkan oleh *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* melalui platform seperti MinION dan GridION, yang menawarkan kemampuan pengurutan DNA secara real-time dengan fleksibilitas tinggi dan potensi besar untuk aplikasi penelitian maupun diagnostik klinis (Heather & Chain, 2016).

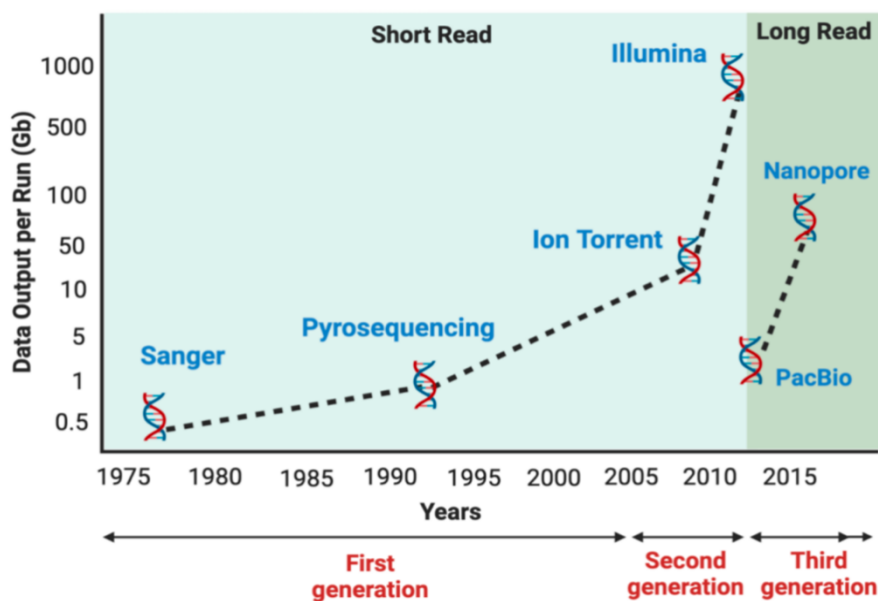
### **2.3.6 Next Generation Sequencing (NGS)**

#### **a. Definisi NGS**

NGS adalah teknologi baru untuk pengurutan DNA dan RNA serta deteksi varian/mutasi. Teknologi ini menggabungkan keunggulan kimia pengurutan yang unik, matriks pengurutan yang berbeda, dan teknologi bioinformatika. Kombinasi seperti itu memungkinkan pengurutan paralel dari berbagai panjang rangkaian DNA atau RNA atau bahkan seluruh genom dalam periode waktu yang relatif singkat (Overbeek *et al.*, 2024). NGS mengacu pada metode pengurutan DNA berbasis *non-Sanger* yang telah menggantikan metode pengurutan konvensional. Metode ini digunakan untuk analisis genom lengkap (pengurutan seluruh genom), pengkode ekson dalam gen (pengurutan seluruh exome), dan hanya mengkode wilayah gen yang dipilih (*panel target*) (Wensel *et al.*, 2022).

#### **b. Perkembangan NGS**

Teknologi untuk “membaca” urutan DNA telah berkembang pesat selama dua dekade terakhir. Kemajuan pesat ini telah membuka jalan bagi terobosan signifikan di bidang sekuensing DNA, yang mengarah pada munculnya tiga generasi teknologi sekuensing (**Gambar 3**) (Satam *et al.*, 2023).



**Gambar 3.** Perkembangan Teknologi Sekuensing (Satam *et al.*, 2023).

Upaya pertama dalam mengurutkan DNA dan RNA melibatkan degradasi kimia atau pembelahan enzimatik pada molekul untuk menghasilkan fragmen yang dapat dianalisis secara individual. Teknik ini menggunakan dideoksinukleotida, yang mengakhiri pemanjangan rantai untai DNA selama replikasi, dan memungkinkan produksi pembacaan urutan hingga beberapa ratus nukleotida panjangnya. Metode Sanger diadopsi secara luas dan merevolusi bidang biologi molekuler dengan memungkinkan pengurutan DNA dan RNA secara cepat (Satam *et al.*, 2024). Selanjutnya, metode pengurutan generasi kedua telah merevolusi pengurutan DNA dengan memungkinkan pengurutan ribuan hingga jutaan fragmen DNA secara bersamaan. Metode ini berbeda dari pengurutan Sanger dalam kemampuannya melakukan pengurutan paralel. Teknologi pengurutan generasi kedua ini telah secara signifikan meningkatkan hasil dan kecepatan pengurutan DNA, memungkinkan penerapan yang luas dalam penelitian genomik dan diagnostik klinis. Platform-platform ini telah memungkinkan pengurutan seluruh genom, analisis transkriptome, dan pengurutan bertarget, yang mengarah pada terobosan dalam variasi genetik, penelitian penyakit, dan pengobatan yang dipersonalisasi (Satam *et al.*, 2023).

Teknologi pengurutan generasi ketiga mewakili kemajuan terbaru dalam pengurutan DNA. Teknologi ini memberikan kemampuan pengurutan baca

panjang, memungkinkan pengurutan fragmen DNA yang jauh lebih besar dibandingkan metode sebelumnya, memungkinkan pengurutan fragmen DNA dengan pembacaan panjang hingga puluhan kilobase panjangnya. Metode pengurutan generasi ketiga menjelaskan teknologi yang tersedia di NGS dan jenis data yang dihasilkan di setiap jenis pengujian NGS. Secara ringkas, perbedaan teknologi sekuensing generasi pertama, kedua, dan ketiga dijelaskan dalam **Tabel 5** berikut : (Satam *et al.*, 2023)

**Tabel 5.** Perbedaan teknologi sekuensing generasi pertama, kedua, dan ketiga (Satam *et al.*, 2023)

Aspek	Generasi Pertama	Generasi Kedua (NGS)	Generasi Ketiga (TGS / ONT)
Teknologi	<i>Sanger sequencing</i>	Illumina, Ion Torrent	<i>Oxford Nanopore Technology (ONT), PacBio</i>
Prinsip dasar	<i>Chain termination (ddNTP)</i>	<i>Sequencing by synthesis (massively parallel)</i>	<i>Single-molecule sequencing (real-time)</i>
Panjang read	~500–1000 bp	50–300 bp ( <i>short read</i> )	10 kb – >1 Mb ( <i>long read</i> )
Throughput	Rendah	Sangat tinggi ( <i>massively parallel</i> )	Tinggi
Waktu	Lambat	Cepat	Real-time
Biaya per basa	Mahal	Murah	Mulai menurun, tapi masih relatif tinggi
Akurasi	Sangat tinggi (~99.99%)	Sangat tinggi (Q30 ≈ 99.9%)	Lebih rendah (meningkat dengan teknologi terbaru)
Kebutuhan PCR	Ya	Ya (umumnya)	Tidak selalu (langsung single molecule)
Kemampuan deteksi SV (structural variation)	Terbatas	Terbatas (karena short read)	Sangat baik
Kompleksitas analisis	Rendah	Tinggi ( <i>big data</i> )	Tinggi ( <i>error correction</i> )
Aplikasi utama	Sequencing gen tunggal	<i>Whole genome, RNA-seq</i>	<i>De novo assembly, epigenetik, long-read transcriptomics</i>

### c. Tahapan NGS

NGS melibatkan beberapa tahapan dalam pengurutan yaitu fragmentasi DNA, *Library preparation/NGS Library*, *NGS Sequencing*, dan interpretasi varian.

#### - **Fragmentasi DNA**

Fragmentasi DNA merupakan tahapan penting dalam proses library preparation pada teknologi *next-generation sequencing* (NGS) yang bertujuan memecah DNA target menjadi fragmen-fragmen pendek agar kompatibel dengan platform sekuensing. Umumnya, DNA difragmentasi menjadi segmen berukuran sekitar 100–300 bp untuk mempermudah proses amplifikasi, ligasi adaptor, dan pembacaan sekuens. Proses fragmentasi dapat dilakukan melalui metode mekanis, enzimatik, maupun metode lainnya. Fragmentasi mekanis, seperti sonication dan acoustic shearing menggunakan teknologi *Adaptive Focused Acoustics* (AFA) dari Covaris, bekerja dengan memecah DNA secara fisik dan biasanya diikuti dengan proses ligasi adaptor (Deurenberg *et al.*, 2017).

Sementara itu, fragmentasi enzimatik dilakukan menggunakan endonuklease atau transposon yang secara simultan memotong DNA dan menambahkan adaptor. Fragmentasi mekanis memiliki keunggulan karena menghasilkan distribusi panjang fragmen yang lebih homogen dan relatif tidak dipengaruhi oleh inhibitor enzim yang terdapat pada sampel, sehingga sangat sesuai digunakan pada sampel klinis langsung seperti biopsi dan feses. Kualitas dan ukuran fragmen DNA yang optimal sangat memengaruhi keberhasilan pembentukan library, distribusi coverage, serta akurasi hasil sekuensing secara keseluruhan. Oleh karena itu, pemilihan metode fragmentasi perlu disesuaikan dengan kualitas sampel, tujuan pemeriksaan, dan platform NGS yang digunakan (Jansson *et al.*, 2024).

#### - **Library Preparation**

*Library preparation* adalah proses di mana segmen DNA dimodifikasi sehingga setiap sampel DNA dapat memiliki indeks sampel tertentu yang membantu mengidentifikasi pasien yang menjadi asal pengurutan DNA. Proses ini juga memungkinkan adaptor pengurutan ditambahkan ke segmen DNA. Modifikasi seperti itu memungkinkan primer pengurutan untuk mengikat semua

segmen DNA dan kemudian memungkinkan pengurutan paralel masif (Agudelo-Pérez *et al.*, 2023).

- **Sekuensing NGS**

Sekuensing paralel masif dilakukan menggunakan sequencer NGS. *Library* diunggah ke matriks sekuensing dalam sequencer tertentu. Sequencer yang berbeda memiliki matriks sequencing yang berbeda. Namun, tujuannya sama, yaitu memungkinkan pengurutan paralel masif dari semua segmen DNA pada saat yang bersamaan. Informasi sekuens yang dihasilkan dari sequencing paralel masif tersebut dianalisis menggunakan perangkat lunak bioinformatika (Jansson *et al.*, 2024).

- **Interpretasi Varian**

Analisis bioinformatika merupakan komponen utama dalam alur kerja *next-generation sequencing* (NGS) karena berperan mengubah data mentah hasil sekuensing menjadi informasi genomik yang dapat diinterpretasikan secara biologis maupun klinis. Berdasarkan perkembangan teknologi NGS terbaru, analisis bioinformatika secara umum dibagi menjadi tiga tahapan utama, yaitu *primary analysis*, *secondary analysis*, dan *tertiary analysis*. *Primary analysis* mencakup proses *base calling* dan penghitungan skor kualitas (*quality scoring*) yang dilakukan langsung oleh instrumen sekuensing untuk mengubah sinyal mentah menjadi urutan nukleotida digital. Tahap ini menghasilkan jutaan *sequence reads* beserta nilai kualitas yang digunakan untuk menilai akurasi pembacaan basa. Selanjutnya, *secondary analysis* meliputi proses *assembly* dan *alignment*, yaitu penyelarasan hasil pembacaan terhadap genom referensi atau penyusunan fragmen DNA menjadi urutan genom yang lebih lengkap apabila tidak tersedia genom referensi. Tahapan ini penting untuk memastikan posisi dan kesesuaian setiap fragmen DNA yang diperoleh selama proses sekuensing (Jansson *et al.*, 2024).

Tahap berikutnya adalah *tertiary analysis* yang mencakup *variant calling*, anotasi, dan interpretasi varian genomik. Pada tahap ini, data hasil penyelarasan dibandingkan dengan genom referensi untuk mengidentifikasi adanya perubahan genetik seperti *single nucleotide variants* (SNV), insersi, delesi, maupun variasi struktural lainnya. Varian yang terdeteksi kemudian

dianotasi menggunakan berbagai basis data genomik untuk menentukan lokasi gen, frekuensi populasi, dampak fungsional terhadap protein, serta kemungkinan signifikansi klinisnya. Dalam praktik klinis modern, proses interpretasi varian juga melibatkan integrasi data bioinformatika dengan informasi fenotip pasien dan literatur ilmiah untuk menentukan apakah suatu varian bersifat patogenik, kemungkinan patogenik, atau jinak. Perkembangan algoritma bioinformatika dan *artificial intelligence* turut meningkatkan akurasi serta efisiensi analisis data NGS, sehingga teknologi ini semakin banyak digunakan dalam diagnostik molekuler, penyakit genetik, kanker, dan mikrobiologi klinis (Jansson *et al.*, 2024).

#### **e. Aplikasi Klinis NGS**

Teknologi *next-generation sequencing* (NGS) telah berkembang menjadi salah satu alat utama dalam praktik kedokteran modern karena mampu menganalisis materi genetik secara cepat, paralel, dan dengan sensitivitas tinggi. Dalam aplikasi klinis, NGS memungkinkan pemeriksaan banyak gen dan berbagai jenis mutasi secara simultan hanya dari jumlah sampel yang kecil, sehingga sangat bermanfaat pada kondisi dengan keterbatasan spesimen biopsi. Kemampuan *massively parallel sequencing* pada NGS meningkatkan efisiensi pemeriksaan molekuler dibandingkan metode konvensional, serta mempercepat waktu diagnosis dan pengambilan keputusan terapeutik. Teknologi ini banyak digunakan dalam *precision medicine* untuk mendukung klasifikasi diagnostik penyakit, pemilihan terapi target, evaluasi prognosis, dan pemantauan respons pengobatan, khususnya pada penyakit genetik, kanker, dan kelainan hereditas lainnya. Selain itu, perkembangan bioinformatika dan integrasi basis data genomik memungkinkan interpretasi varian yang lebih akurat sehingga hasil NGS semakin relevan dalam praktik klinis sehari-hari (Jansson *et al.*, 2024).

Dalam bidang mikrobiologi klinis, NGS juga memberikan perubahan besar dalam identifikasi dan karakterisasi patogen. Berbeda dengan metode konvensional yang bergantung pada kultur, pewarnaan, atau karakteristik metabolik mikroorganisme, NGS memungkinkan identifikasi langsung DNA atau RNA patogen dari spesimen klinis tanpa memerlukan proses kultur. Pendekatan metagenomik berbasis NGS dapat mendeteksi berbagai

mikroorganisme secara simultan, termasuk bakteri, virus, jamur, maupun parasit yang sulit atau tidak dapat dikultur. Selain identifikasi patogen, NGS juga mampu mendeteksi gen resistensi antimikroba dan menganalisis hubungan filogenetik antarisolat sehingga sangat bermanfaat dalam investigasi wabah dan pengendalian infeksi. Oleh karena itu, NGS saat ini dianggap sebagai salah satu teknologi paling menjanjikan dalam laboratorium diagnostik modern karena menyediakan informasi molekuler yang komprehensif dalam satu platform pemeriksaan (Gu *et al.*, 2019).

NGS memungkinkan pengurutan seluruh genom berbagai patogen dalam satu rangkaian, baik dari isolat bakteri pasien (berbeda), atau dari beberapa spesies yang ada dalam materi pasien dari satu individu (*metagenomics*). Keuntungan besar NGS adalah, berbeda dengan pengurutan *Sanger*, satu protokol dapat digunakan untuk semua patogen baik untuk identifikasi maupun klasifikasi. Oleh karena itu, teknologi ini telah terbukti bermanfaat di laboratorium mikrobiologi medis dan untuk tindakan pencegahan infeksi (Deurenberg *et al.*, 2017).

#### **f. Teknologi Nanopore**

*Next Generation Sequencing (NGS)* yang merupakan teknologi sekuensing generasi kedua yang memungkinkan analisis genom secara paralel dengan throughput tinggi dan akurasi yang baik, sehingga berperan penting dalam identifikasi variasi genetik dan analisis genom secara luas. Namun, teknologi ini menghasilkan *short reads* yang membatasi kemampuannya dalam mengidentifikasi varian struktural kompleks, daerah genom berulang, serta perakitan genom secara utuh. Keterbatasan tersebut mendorong pengembangan teknologi sekuensing generasi ketiga, yaitu *Oxford Nanopore Technology (ONT)*, yang mampu menghasilkan *long reads* secara real-time dan memungkinkan karakterisasi genom yang lebih komprehensif tanpa memerlukan proses amplifikasi. Dengan demikian, ONT melengkapi kemampuan NGS dengan menyediakan informasi struktural yang lebih lengkap, dan integrasi keduanya melalui pendekatan hibrida telah terbukti efektif dalam meningkatkan akurasi, kelengkapan, dan keandalan analisis genom untuk berbagai aplikasi penelitian dan diagnostik klinis (Magi *et al.*, 2017).

Teknologi sekuensing *nanopore* sebagai bagian dari sekuensing generasi ketiga memungkinkan pembacaan langsung molekul DNA dan RNA panjang secara *real-time*, sehingga mengurangi bias yang umumnya terjadi pada metode berbasis amplifikasi dan sintesis. Kemampuan menghasilkan *long reads* mendukung perakitan genom secara lebih lengkap, identifikasi varian struktural dengan resolusi yang lebih tinggi, serta karakterisasi isoform transkrip secara lebih komprehensif dibandingkan metode *short-read*. Selain itu, teknologi ini memungkinkan deteksi langsung modifikasi basa, seperti metilasi DNA, tanpa memerlukan perlakuan kimia tambahan, sehingga memperluas cakupan analisis epigenetik dan regulasi gen. Meskipun pada tahap awal memiliki tingkat kesalahan pembacaan yang relatif lebih tinggi, perkembangan algoritma base-calling, metode koreksi kesalahan, dan pendekatan bioinformatika telah secara signifikan meningkatkan akurasi dan keandalan data, sehingga memperkuat penerapan teknologi *nanopore* dalam penelitian genomik dan diagnostik klinis (Cao *et al.*, 2022; Magi *et al.*, 2017).

Konsep dasar teknologi *nanopore* berasal dari prinsip deteksi molekul tunggal yang pertama kali dikembangkan pada 1980-an, di mana molekul yang melewati nanopore menyebabkan perubahan arus listrik yang mencerminkan karakteristik basanya. Penemuan penting pada akhir 1990-an, termasuk pemanfaatan *nanopore* biologis seperti *alpha-hemolysin*, menjadi landasan bagi pengembangan teknologi sekuensing nanopore modern. Sistem ini menggunakan pori biologis atau sintesis yang tertanam dalam membran untuk memisahkan dua ruang elektrolit, sehingga perubahan arus ionik yang terjadi saat molekul DNA atau RNA melewati pori dapat diukur dan dianalisis untuk menentukan urutan basa secara langsung. Teknologi ini kemudian dikembangkan dan dikomersialisasikan oleh *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) menjadi perangkat portabel berbasis chip yang praktis dan terjangkau, sehingga memperluas aksesibilitas dan penerapannya dalam berbagai bidang genomik dan epigenetik (MacKenzie & Argyropoulos, 2023; W. Shi *et al.*, 2017).

Penerapan teknologi ONT dalam bidang biomedis telah menunjukkan kinerja yang andal dalam analisis mikrobioma dan deteksi patogen. Studi oleh (Cha *et al.*, 2023) menunjukkan bahwa ONT mampu mengidentifikasi profil

mikrobioma usus neonatus secara konsisten dengan tingkat kesesuaian yang tinggi dibandingkan metode Illumina, serta mengungkapkan perbedaan signifikan antara mikrobioma bayi prematur dan cukup bulan, termasuk peningkatan bakteri menguntungkan pada bayi cukup bulan. Selain itu, studi kohort prospektif oleh (Chaemsaitong *et al.*, 2025) menggunakan sekuensing *nanopore* gen 16S rDNA pada sampel cairan amnion dari pasien dengan persalinan prematur atau preterm prelabor rupture of membranes menunjukkan bahwa metode ini memiliki kinerja diagnostik yang tinggi, dengan sensitivitas 88,9%, spesifisitas 95,4%, dan akurasi 94,2%. Penelitian tersebut juga menunjukkan korelasi positif yang kuat antara jumlah bakteri dan tingkat respons inflamasi intraamniotik, yang menegaskan kemampuan teknologi nanopore dalam mendeteksi infeksi secara akurat. Hasil ini menegaskan bahwa teknologi ONT memiliki potensi besar sebagai metode diagnostik molekuler yang cepat, akurat, dan komprehensif dalam mendukung praktik klinis modern. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan teknologi NGS-ONT sebagai pendekatan analisis metagenomik untuk memperoleh identifikasi bakteri secara lebih komprehensif (Chaemsaitong *et al.*, 2025).

#### **2.4. Ringkasan Perbandingan Metode Identifikasi bakteri Berbasis Kultur Darah dan Metagenomik (NGS-ONT) terhadap Diagnosa Sepsis Neonatorum Awitan Dini**

Berdasarkan hasil kajian terhadap berbagai literatur, metode kultur darah dan pendekatan berbasis metagenomik menunjukkan perbedaan mendasar dalam prinsip pemeriksaan dan karakteristik diagnostiknya. Perbedaan tersebut mencakup aspek prosedur pengambilan sampel, kebutuhan volume darah, tahapan analisis, waktu pemeriksaan, serta kemampuan dalam mendeteksi bakteri. Selain itu, keterbatasan metode kultur darah dan perkembangan pendekatan berbasis metagenomik turut menjadi pertimbangan dalam upaya meningkatkan identifikasi etiologi infeksi pada neonatus. Berdasarkan kajian tersebut, kedua metode dapat disimpulkan memiliki karakteristik yang berbeda dan bersifat komplementer dalam praktik klinis. Oleh karena itu, perbandingan kedua metode tersebut berdasarkan studi ilmiah terkini (Chen *et al.*, 2022) disajikan secara pada **Tabel 6**.

**Tabel 6.** Perbandingan Metode Identifikasi bakteri Berbasis Kultur Darah dan NGS-ONT terhadap Diagnosa Sepsis Neonatorum Awitan Dini

No	Aspek Perbandingan	NGS ( <i>Next-Generation Sequencing</i> )	Kultur Darah ( <i>Blood Culture</i> )
1	<b>Prosedur Pengambilan &amp; Persiapan Sampel</b>	Sampel darah/plasma diambil dengan volume sangat kecil (<200 $\mu$ L cfDNA. DNA diekstraksi dan diproses lebih lanjut.	Sampel darah diambil secara steril (0,5–1 mL pada neonatus, ideal $\geq$ 1 mL/kg) lalu diinokulasikan ke botol media kultur.
2	<b>Langkah-langkah Utama</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sampel yang lolos <i>quality control</i> dilakukan library preparation (amplifikasi fragmen, perbaikan ujung DNA, ligasi <i>barcode</i>, dan pemasangan adapter).</li> <li>• Library kemudian disekuensing menggunakan platform <i>Oxford Nanopore</i> melalui MinKNOW.</li> <li>• Hasil <i>sequencing</i> dilakukan <i>basecalling</i> menggunakan Dorado.</li> <li>• Data selanjutnya dianalisis secara bioinformatika menggunakan <i>Pavian</i>, <i>RStudio</i>, <i>NanoPlot</i>, <i>NanoFilt</i>, dan <i>Centrifuge</i> dengan database 16S rRNA RefSeq NCBI, serta divisualisasikan menggunakan <i>Pavian</i> dan <i>Krona Tools</i>.</li> </ul>	Inkubasi otomatis dilakukan selama 24–72 jam. Jika positif, subkultur, identifikasi <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> dan uji sensitivitas antibiotik dilakukan.
3	<b>Waktu Hasil (Turnaround Time)</b>	Hasil diperoleh dalam 24–48 jam (rata-rata 1–3 hari), sehingga memungkinkan diagnosis dini yang lebih cepat.	Deteksi awal dilakukan dalam 24–72 jam, sedangkan identifikasi lengkap memerlukan 3–5 hari (rata-rata ~4,8 hari).
4	<b>Volume Darah yang Dibutuhkan</b>	Volume sangat kecil digunakan (<200 $\mu$ L plasma/cfDNA), sehingga sangat aman dan <i>feasible</i> pada neonatus dengan volume darah terbatas.	Volume lebih besar dibutuhkan (minimum 0,5 mL, ideal 1 mL/kg), yang sering sulit dicapai pada neonatus prematur.
5	<b>Tingkat Positif (Positivity Rate)</b>	Tingkat positif jauh lebih tinggi dicapai (57,8–89%), dengan deteksi tambahan hingga 50–60% pada kasus kultur-negatif.	Tingkat positif rendah dicapai (6,5–13,8%) dan sering hanya <25% pada kasus EOS.
6	<b>Sensitivitas</b>	Sensitivitas tinggi dicapai (62–99%) dan unggul pada	Sensitivitas rendah dicapai (10–35% pada EOS) dan

		virus, fungi, polymicrobial, serta kasus setelah pemberian antibiotik.	sangat dipengaruhi oleh penggunaan antibiotik sebelumnya.
7	<b>Spesifisitas</b>	Spesifisitas sedang dicapai (57–94%); risiko <i>false positive</i> dapat dikelola dengan interpretasi klinis dan <i>threshold</i> yang tepat.	Spesifisitas tinggi dicapai (~98%, <i>gold standard</i> ), meskipun risiko kontaminasi kulit tetap ada.
8	<b>Kelebihan Utama</b>	Deteksi luas dan unbiased dilakukan terhadap bakteri, virus, fungi, parasit, serta infeksi campuran. Pengaruh antibiotik prenatal dapat dihindari sepenuhnya. Volume sampel kecil sangat cocok untuk neonatus. Patogen sulit dikultur dapat terdeteksi dengan baik. Modifikasi terapi tercapai pada 39–80% kasus.	Data resistensi antibiotik diperoleh secara langsung. Metode ini murah, tersedia luas, dan menjadi <i>gold standard</i> untuk bakteri umum seperti GBS dan <i>E. coli</i> .
9	<b>Kekurangan Utama</b>	Biaya tinggi dan standarisasi untuk neonatus belum sempurna. Interpretasi hasil memerlukan kehati-hatian terhadap kontaminasi. Data resistensi masih terbatas.	Waktu pemeriksaan lama. Sensitivitas rendah pada neonatus EOS. Virus, fungi, dan infeksi campuran sulit terdeteksi. Kultur-negatif sering terjadi (44–60%).
10	<b>Dampak pada Diagnosis EOS Dini</b>	Keunggulan sangat jelas pada kasus kultur-negatif yang umum di EOS. Identifikasi etiologi meningkat hingga 50–93%, terapi target dapat dipandu lebih cepat, <i>overuse</i> antibiotik berkurang, dan mortalitas cenderung lebih rendah. Kombinasi dengan kultur sangat direkomendasikan.	Status sebagai <i>gold standard</i> untuk konfirmasi bakteri dipertahankan, tetapi hasil negatif sering menyebabkan terapi empiris yang berkepanjangan dan meningkatkan risiko resistensi.

Berdasarkan berbagai studi yang membandingkan keberhasilan deteksi patogen antara metode kultur darah dan *next-generation sequencing* (NGS), terlihat pola yang konsisten bahwa NGS menunjukkan tingkat deteksi yang lebih tinggi dibandingkan kultur darah. Tingkat keberhasilan deteksi kultur darah dilaporkan berkisar antara 0% hingga 59,1%, sedangkan NGS berada pada kisaran 44% hingga 89,36%. Perbedaan ini tampak jelas pada beberapa penelitian, seperti (Cao *et al.*, 2022) yang melaporkan 1,20% (1/83) dibandingkan 61,45% (51/83), serta (Wu *et al.*, 2014) dengan 0% (0/45) dibandingkan 44% (20/45). Pola serupa juga terlihat pada (Chen *et al.*, 2022), (Sun *et al.*, 2022) (Y. Liu *et al.*, 2025) dan

(Ma *et al.*, 2020) di mana proporsi deteksi NGS secara konsisten lebih tinggi pada berbagai ukuran sampel dan setting penelitian. Bahkan pada studi dengan tingkat deteksi kultur darah yang relatif lebih tinggi, seperti (Yu *et al.*, 2025) sebesar 59,1% (75/127), NGS tetap menunjukkan proporsi yang lebih besar yaitu 86,6% (110/127) (telah ditunjukkan pada **Tabel 2**). Meskipun tidak seluruh penelitian tersebut secara spesifik dilakukan pada populasi sepsis neonatorum awitan dini, konsistensi hasil di berbagai kelompok pasien dan kondisi klinis menunjukkan bahwa metode NGS memiliki kemampuan deteksi yang lebih tinggi secara umum, sehingga berpotensi memberikan kontribusi yang relevan dalam meningkatkan identifikasi patogen, termasuk pada kasus sepsis awitan dini.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif untuk menganalisis perbandingan identifikasi bakteri patogen dari hasil kultur darah dan NGS pada bayi prematur sehat dan bayi prematur dengan sepsis. Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan kemampuan diagnostik pada analisa metagenomik dan baku emas kultur darah dalam penegakan etiologi sepsis neonatorum pada bayi prematur

#### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Rekrutmen subjek, pemeriksaan fisik, laboratorium, kultur darah dilakukan di Ruang Perinatologi RSUD Dr. Abdul Moeloek Lampung (Bandar Lampung, Lampung), analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biomolekuler INALAB DNA (Bandar Lampung, Lampung), dan Sekuensing NGS-ONT dilakukan di Apical Scientific, Selangor, Malaysia dengan bantuan jasa PT. Genetika Science (Tangerang, Banten). Penelitian ini telah dilakukan pada September 2024 hingga Maret 2025.

#### 3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah bayi prematur. Sampel penelitian adalah bayi prematur yang secara klinis mengalami sepsis neonatorum awitan dini (SNAD) dan bayi prematur sehat yang dirawat di RSUD Dr. Abdul Moeloek selama periode perawatan dengan kelompok kontrol bayi prematur yang secara klinis sehat.

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah:

1. Bayi prematur berusia kurang dari 37 minggu
2. Belum mendapatkan terapi antibiotik saat akan dilakukan pemeriksaan

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah:

3. Bayi dengan kondisi klinis berat lainnya atau mengancam nyawa
4. Bayi prematur yang sudah mendapatkan terapi antibiotik
5. Sampel tali pusat yang dikumpulkan tidak mencukupi untuk dilakukan pemeriksaan kultur dan analisis metagenomik.

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus beda proporsi yang dihitung menggunakan aplikasi OpenEpi (Bhardwaj *et al.*, 2024) :

### Sample Size for Frequency in a Population

Population size(for finite population correction factor or fpc)(N):	15000000
Hypothesized % frequency of outcome factor in the population (p):	1.847%+/-10
Confidence limits as % of 100(absolute +/- %)(d):	10%
Design effect (for cluster surveys-DEFF):	1

#### Sample Size(n) for Various Confidence Levels

ConfidenceLevel(%)	Sample Size
95%	7
80%	3
90%	5
97%	9
99%	13
99.9%	20
99.99%	28

#### Equation

$$\text{Sample size } n = [\text{DEFF} * N * p(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$$

**Gambar 4. Perhitungan Besar Sampel** (Bhardwaj *et al.*, 2024)

Berdasarkan rumus besar sampel didapatkan jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 7 orang, sehingga besar sampel minimal pada penelitian ini adalah 14 orang tiap kelompok.

Keterangan :

$Z\alpha$  = Derajat Kepercayaan = 95% = 1,96

N = Jumlah populasi bayi prematur = 15.000.000 bayi.

P = Proporsi kejadian sepsis awitan dini pada bayi prematur = 1,847%

d = presisi = 10% = 0,1

Total sampel yang didapatkan yaitu 30 sampel pada kelompok bayi prematur sehat dan 30 sampel pada kelompok bayi prematur SNAD. Darah bayi prematur sehat dan juga pada bayi SNAD dengan hasil kultur darah negatif dipilih secara purposive sebanyak 3 sampel untuk dilakukan analisis metagenomik bakteri menggunakan teknologi NGS berbasis *Oxford Nanopore Technologies* (ONT). Jumlah sampel ditentukan berdasarkan tujuan eksploratif penelitian, kompleksitas teknis analisis metagenomik, serta tingginya biaya sekuensing. Selain itu, penelitian ini menggunakan

pendekatan pilot *proof-of-concept* untuk mengevaluasi potensi penerapan metode metagenomik dalam mendeteksi bakteri pada kasus sepsis dengan kultur negatif. Pendekatan eksploratif dengan jumlah sampel terbatas telah banyak digunakan dalam penelitian awal *penerapan metagenomic Next-Generation sequencing* (mNGS) di bidang klinis (Matsuo *et al.*, 2021; Agudelo-Pérez *et al.*, 2023).

### 3.4. Persetujuan Etik

Penelitian ini melibatkan bayi prematur sebagai subjek penelitian. Sebelum penelitian telah dilakukan pengajuan protokol penelitian kepada Komite Etik Penelitian RSUD Dr. Abdul Moeloek Lampung dengan nomor 000.9.2/1049A/VII.01/III/2025 untuk dilakukan telaah dan persetujuan etik.

Pada bayi yang memenuhi kriteria sebagai subjek penelitian dilakukan penjelasan mengenai rencana penelitian pada orang tuanya. Kedua orang tua diberikan kepastian bahwa penelitian ini tidak akan menunda rencana terapi yang diberikan kepada anaknya. Orang tua yang sudah mengetahui secara penuh dan memberikan izin untuk diikutsertakan sebagai subjek penelitian dimintakan persetujuannya secara tertulis melalui *informed consent*. Kerahasiaan identitas subjek pada penelitian ini menjadi aspek yang diperhatikan dalam penelitian ini.

### 3.5. Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.5.1. Variabel Bebas dan Variabel Terikat

Variabel bebas pada penelitian ini adalah hasil diagnosis bakteri patogen melalui analisa metagenomik sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pemeriksaan kultur darah.

#### 3.5.2. Definisi Operasional Penelitian

Definisi operasional variabel penelitian ditunjukkan oleh **Tabel 8** berikut :

**Tabel 7.** Definisi Operasional Variabel Penelitian

Variabel	Definisi	Cara Ukur/Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Sepsis	Sindrom klinik dari adanya disfungsi organ akibat respon tubuh terhadap suatu infeksi yang ditandai dengan adanya bakteremia	Anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan penunjang	Sepsis Tidak Sepsis	Nominal

<b>Bayi Prematur</b>	Bayi yang lahir hidup sebelum usia kehamilan 37 minggu	Usia kehamilan saat persalinan	Prematur Tidak Prematur	Nominal
<b>bakteri Patogen</b>	bakteri yang akan diidentifikasi pada bayi prematur sepsis dan bayi sehat.	NGS dan Kultur Darah dari Plasenta	10 bakteri patogen terbanyak	-
<b>Kultur Darah</b>	Hasil pemeriksaan kultur darah dari plasenta bayi prematur sepsis dan bayi sehat	Media kultur dengan agar BHI dan atau tioglikolat	1 = Spesies patogen teridentifikasi 2 = Spesies patogen tidak teridentifikasi	Nominal
<b>NGS</b>	Hasil pemeriksaan sekuensing gen dengan Analisa Metagenomik dinyatakan dalam identifikasi spesies pada bayi prematur sepsis dan bayi sehat	Analisa metagenomik dengan Perangkat lunak <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) dari <i>Oxford Nanopore Technology</i> (ONT)	1 = Spesies patogen teridentifikasi 2 = Spesies patogen tidak teridentifikasi	Nominal

### 3.6 Bahan, Alat dan Prosedur Pemeriksaan

#### 3.6.1 Penegakan Kecurigaan Klinis Sepsis Neonatorum

Pada seluruh calon subjek yakni bayi prematur yang dicurigai mengalami sepsis neonatorum dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan penunjang. Anamnesa dilakukan untuk mendapatkan data mengenai data demografis pasien dan orang tuanya, riwayat kehamilan, perjalanan klinis pasien dan penggunaan obat terdahulu. Pada pemeriksaan fisik dilakukan untuk mendapatkan data tanda vital pasien, status gizi dan adanya kelainan medis lain. Pada pemeriksaan penunjang dilakukan untuk mendapatkan data darah lengkap pasien dan pemeriksaan laboratorium lain yang mendukung

Penegakan kecurigaan klinis dilakukan berdasarkan hasil anamnesis dan pemeriksaan fisik. Kecurigaan klinis terhadap adanya sepsis neonatorum ditegakkan berdasarkan adanya gejala yang mengarah pada sindrom respon inflamasi sistemik/SIRS. SIRS ditegakkan bila ditemukan minimal 2 dari 4 gejala berikut ini (suhu atau jumlah sel darah putih abnormal harus terpenuhi pada salah satu kriteria) (Wulandari *et al.*, 2018):

- Suhu inti tidak normal ( $<36^{\circ}\text{C}$  atau  $>38,5^{\circ}\text{C}$ )

- Laju nadi abnormal ( $> 2$  standar deviasi di atas normal untuk usia, atau  $< p10$  untuk usia jika anak berusia  $< 1$  tahun)
- Laju napas meningkat ( $> 2$  SD untuk usia, atau penggunaan ventilasi mekanis pada penyakit paru akut)
- Jumlah sel darah putih abnormal (sesuai usia) atau  $> 10\%$  leukosit imatur.

### 3.6.1.1 Prosedur Kerja

- Waktu pengambilan darah dilakukan segera setelah bayi dilahirkan
- Pengambilan darah dilakukan dari plasenta bayi
- Darah dimasukkan ke dalam *collection tube* EDTA yang sudah disiapkan sebanyak 3mL

### 3.6.2 Pengujian berbasis kultur darah

Setelah dilakukan pengambilan sampel darah dilanjutkan dengan inokulasi ke media kultur dengan tahapan:

1. Darah yang telah diambil segera diinokulasikan ke dalam botol media kultur khusus untuk mendukung pertumbuhan bakteri aerob dan anaerob berisi media *Bactec*.
2. Botol kultur darah disegel dengan baik dan diberi label dengan informasi pasien dan waktu pengambilan sampel.
3. Botol kultur kemudian dimasukkan ke mesin penghitung bakteri otomatis selama 24 jam (apabila hasil masih negatif, ditunggu hingga 5x24 jam).
4. Setelah botol kultur menunjukkan hasil positif, dilakukan penentuan Gram.
5. Sebanyak 0,1 mL hasil kultur diambil dengan spuit.
6. Eksklusi Gram positif dilakukan dengan media *MacConkey* agar (karena media ini spesifik Gram negatif).
7. Dilakukan inokulasi juga pada media *Blood Agar*.
8. Bakteri diinkubasi selama 1x24 jam (apabila bakteri sulit untuk dikultur, dapat ditunggu 5-10 hari).

### 3.6.3 Analisis Molekuler Berbasis *Next-Generation Sequencing Oxford Nanopore Technology* (NGS ONT)

Tahap identifikasi bakteri patogen melalui pendekatan molekuler pada sampel sehat maupun sepsis awitan dini, diawali dengan ekstraksi DNA dilanjutkan dengan amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), elektroforesis, dan analisis metagenomik dengan NGS-ONT.

#### 3.6.3.1 Ekstraksi DNA

Setiap sampel diekstraksi menggunakan tiga pendekatan berbeda, yaitu: (1) metode ekstraksi DNA dari darah segar (*fresh blood*), (2) metode ekstraksi DNA bakteri Gram positif, dan (3) metode ekstraksi DNA bakteri Gram negatif.

##### a. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA yaitu spesimen darah, kit ekstraksi untuk metode ekstraksi darah segar (*fresh blood*) yaitu *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)* (Geneaid, Taipei, Taiwan) yang terdiri dari *Buffer RBC Lysis*, *buffer GB*, *buffer W1*, *Wash Buffer*; kit ekstraksi untuk metode ekstraksi DNA bakteri Gram positif dan Gram negatif yaitu *Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, AS) yang terdiri dari *nucleic lysis solution*, *protein precipitation solution*, *DNA etanol 100% PA*, *etanol 70% PA*, *etanol 70% teknis*, *enzim litik*, *EDTA 50 mM*, *isopropanol*, dan *es batu*. Alat yang digunakan antara lain *vortex*, *gloves*, *spidol*, *plastik klip*, *laminar air flow*, *oven*, *sprayer*, *cool box*, *microtube 1,5 ml dan 2 ml*, *centrifuge*, *mikropipet (1000 µL, 200 µL, 10 µL)*, *mikrotip (1000 µL, 200 µL, 10 µL)*, *freezer*, *spinner*, dan *spektrofotometer*.

##### b. Prosedur Kerja

1. Metode Ekstraksi DNA Darah Segar (*Fresh Blood*) mengikuti prosedur *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)* (Geneaid, Taipei, Taiwan) :
  - 300 µL darah dipindahkan ke dalam microtube 1,5 mL
  - Ditambahkan *RBC Lysis Buffer* sebanyak 900 µL, kemudian dicampur dengan membalik tabung (tanpa *vortex*).
  - Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit

- Setelah inkubasi, dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit, lalu supernatan dibuang seluruhnya.
- Pelet leukosit disuspensi ulang dengan 100  $\mu$ L RBC Lysis Buffer.
- Sebanyak 200  $\mu$ L GB *Buffer* ditambahkan ke dalam tabung, kemudian dikocok kuat.
- Sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit, dengan inversi tabung setiap 5 menit.
- Sebanyak 200  $\mu$ L etanol 100% PA ditambahkan ke lisat, kemudian dicampur dengan kuat selama 10 detik.
- Campuran tersebut dimasukkan ke dalam GD *Column* yang ditempatkan dalam tabung koleksi 2 mL, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.
- GD *Column* dipindahkan ke tabung koleksi baru setelah sentrifugasi.
- Sebanyak 400  $\mu$ L W1 *Buffer* ditambahkan ke GD *Column*, diikuti sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit.
- Cairan yang tertampung di *collection tube* dibuang, GD *Column* dikembalikan ke *collection tube*.
- Kemudian, 600  $\mu$ L *Wash Buffer* ditambahkan ke GD *Column* dan disentrifugasi lagi dengan parameter yang sama.
- GD *Column* dikeringkan dengan sentrifugasi tambahan selama 3 menit.
- GD *Column* dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL baru.
- Sebanyak 35  $\mu$ L *Elution Buffer* yang telah dipanaskan pada suhu 60°C ditambahkan ke pusat matriks GD *column*.
- Diinkubasi di suhu ruang selama 5 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.
- GD *column* dilepaskan, *microtube* 1,5 mL yang berisi DNA disimpan pada suhu -20°C

## 2. Metode Ekstraksi DNA Gram positif mengikuti prosedur Wizard® Genomic DNA *Purification Kit* (Promega, Madison, AS) :

- 300  $\mu$ L darah dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit
- Diambil *buffy coat* dan plasma yang terpisah

- Dilakukan resuspensi sel secara menyeluruh dalam 480  $\mu$ l 50 mM EDTA/dH<sub>2</sub>O
  - Enzim litik (*lysozyme*) dimasukkan sebanyak 20  $\mu$ l
  - Diinkubasi pada 37°C selama 30–60 menit
  - Disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm
  - Supernatan dikeluarkan
  - Dimasukkan 600  $\mu$ l *Nucleic Lysis Solution*, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*
  - Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C, tiap 5 menit dibolak-balik perlahan, kemudian didinginkan sampai suhu ruang
  - Dimasukkan 200  $\mu$ l *Protein Precipitation Solution*. Kemudian, dihomogenkan dengan vorteks selama 30 detik
  - Diinkubasi dalam es selama 5 menit
  - Sentrifus selama 10 menit pada 10.000 rpm
  - Supernatan dipindahkan ke *tube* 1,5 ml ujung lancip berisi 600  $\mu$ l isopropanol, dihomogenkan perlahan
  - Sentrifus selama 10 menit pada 10.000 rpm
  - Supernatan dituangkan dengan hati-hati dan ditiriskan di atas kertas penyerap bersih
  - Ditambahkan 600  $\mu$ l etanol 70% dan dibolak-balik dan di tapping untuk mencuci pellet DNA
  - Sentrifus selama 10 menit pada 10.000 rpm
  - Tabung ditiriskan di atas kertas penyerap bersih dan pellet sampai kering
  - Ditambahkan 35  $\mu$ l *DNA Rehydration Solution* ke dalam tabung
  - DNA direhidrasi dengan menginkubasi pada 65°C selama 1 jam. Larutan dihomogenkan secara berkala tiap 15 menit dengan mengetuk tabung dengan lembut dan *dispin down*
  - Disimpan di -20°C
3. Metode Ekstraksi DNA Gram negatif mengikuti prosedur Wizard® Genomic DNA *Purification Kit* (Promega, Madison, AS) :
- 300  $\mu$ L darah dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL

- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit
- Diambil *buffy coat* dan plasma yang terpisah
- Masukkan 600  $\mu$ l *Nucleic Lysis Solution*, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*
- Diinkubasi selama 5 menit pada suhu 80°C, kemudian didinginkan sampai suhu ruang
- Dimasukkan 200  $\mu$ l *Protein Precipitation Solution*. Kemudian, dihomogenkan dengan *vortex*
- Diinkubasi dalam es selama 5 menit
- Sentrifus selama 10 menit pada 10.000 rpm
- Supernatan dipindahkan ke tube 1,5 ml ujung lancip steril berisi 600  $\mu$ l isopropanol, dihomogenkan dengan cara sedot buang perlahan
- Sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
- Supernatan dituangkan dengan hati-hati dan ditiriskan di atas kertas penyerap bersih
- Ditambahkan 600  $\mu$ l etanol 70% dan dibolak-balik untuk mencuci pellet DNA
- Sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
- *Microtube* ditiriskan di atas kertas penyerap bersih dan pellet hingga mengering
- Ditambahkan 35  $\mu$ l DNA *Rehydration Solution* ke dalam tube
- DNA direhidrasi dengan menginkubasi pada 65°C selama 1 jam. Larutan dihomogenkan secara berkala tiap 15 menit dengan mengetuk tabung dengan lembut dan *dispin down*
- Disimpan di -20°C

### 3.6.3.2 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Ekstraksi DNA

#### a. Bahan & Alat

Bahan yang digunakan terdiri dari sampel DNA hasil ekstraksi dan larutan TE (Tris-EDTA). Alat yang digunakan yaitu 752N UV-VIS *Spectrophotometer* (Hinotek, Ningbo, Tiongkok), kuvet berukuran 350  $\mu$ L, mikropipet, mikrotip, *microtube* 1,5 mL, *tissue non-fabric*.

## b. Prosedur Kerja

DNA hasil ekstraksi diencerkan 100 kali dengan pelarut DNA TE (Tris-EDTA) (melarutkan 1  $\mu\text{L}$  sampel DNA dengan 99  $\mu\text{L}$  TE) kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan spektrofotometer pada 2 nilai absorbansi yaitu  $\text{OD}_{260}$  dan  $\text{OD}_{280}$ . Kemurnian dihitung dari rasio nilai absorbansi pada  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  (Sophian *et al.*, 2021). Setiap  $\text{OD}_{260}$  yang bernilai 1 ( $\text{OD}_{260} = 1$ ) sama dengan 50 ng/ml DNA (Ma *et al.*, 2020). Rumus penghitungan konsentrasi DNA:

Konsentrasi DNA (ng/ $\mu\text{L}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$

Kemurnian DNA terhadap kontaminan dengan membandingkan nilai absorbansi 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) yang membaca asam nukleat (Sophian *et al.*, 2021) dengan nilai absorbansi 280 nm ( $\text{OD}_{280}$ ) yang membaca protein (Li *et al.*, 2021). DNA tergolong murni jika memiliki rasio  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  antara 1,8 sampai 2,0 (Sophian *et al.*, 2021). Prosedur kerja untuk analisis ini yaitu sebagai berikut :

- Alat dinyalakan selama 30 menit sebelum digunakan.
- Sebanyak 300  $\mu\text{L}$  larutan TE dimasukkan ke dalam kuvet 1 berkapasitas 350  $\mu\text{L}$ .
- Sebanyak 297  $\mu\text{L}$  larutan TE dan 3  $\mu\text{L}$  ekstrak DNA dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian dihomogenkan dengan cara inversi.
- Larutan hasil pencampuran dipindahkan ke dalam kuvet 2.
- Kuvet 1 ditempatkan pada holder 1 dan kuvet 2 ditempatkan pada holder 2, dengan bagian buram menghadap ke depan dan bagian bening menghadap ke arah sumber cahaya.
- Tombol A pada pilihan T/A/C/F ditekan untuk memilih mode absorbansi.
- Tombol 100% ditekan untuk mengatur nilai blanko.
- Panjang gelombang diatur dengan memutar knob hingga mencapai 260 nm.
- Tuas ditarik satu kali untuk menempatkan kuvet 1 sebagai blanko tepat pada arah sumber cahaya.
- Tuas ditarik satu kali untuk menempatkan kuvet 2 sebagai sampel tepat pada arah sumber cahaya.
- Pengukuran diulangi pada panjang gelombang 280 nm.
- Langkah yang sama diulangi untuk sampel-sampel berikutnya

### 3.6.3.3 Amplifikasi gen 16S rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR)

Sebelum dilakukan analisis metagenomik berbasis *Next Generation Sequencing* (NGS), DNA bakteri hasil ekstraksi terlebih dahulu diverifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Verifikasi ini dilakukan dengan menargetkan gen 16S rRNA yang merupakan salah satu penanda molekuler yang paling umum digunakan untuk identifikasi dan klasifikasi bakteri (Johnson *et al.*, 2019).

#### a. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan yaitu meliputi i-Taq™ 2X PCR *Mastermix Solution* (iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Korea Selatan), *primer forward* 63 F (10 pM), *primer reverse* 1387 R (10 pM), DNA template hasil ekstraksi, dan buffer TE (Tris-EDTA). Alat yang digunakan yaitu *microtube*, mikrotip, mikropipet, alkohol 70% untuk sterilisasi alat dan area kerja, masker, dan sarung tangan sekali pakai.

#### b. Prosedur Kerja

Tahapan PCR diawali dengan mencampurkan bahan-bahan berikut pada **Tabel 8** ke dalam *tube* PCR berukuran 200µL :

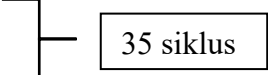
**Tabel 8.** Bahan-Bahan Reaksi PCR

No	Bahan	Volume (µL)
1	<i>Mastermix</i> PCR (i-Taq 2X PCR <i>Mastermix Solution</i> dari iNtRON, Seongnam-Si, Korea Selatan)	10
2	Primer 63 F 10 pM	0,25
3	Primer 1387 R 10 pM	0,25
4	TE	7,5
5	DNA hasil ekstraksi	2,5

Setelah dicampurkan, dilakukan PCR menggunakan alat *Line Gene Mini S* (Bioer, Hangzhou, Tiongkok). Pengaturan *thermocycle* pada alat PCR ditunjukkan oleh **Tabel 9** sebagai berikut:

**Tabel 9.** Pengaturan *Thermocycle*

Tahapan PCR	Temperatur (°C)	Waktu (menit)
Denaturasi Awal	95	5
Denaturasi	95	1
Penempelan	50	1
Pemanjangan	72	1
Pemanjangan akhir	72	5
Pendinginan	25	10



Hasil PCR kemudian divisualisasi untuk melihat ada atau tidaknya pita DNA melalui elektroforesis.

### 3.6.3.4 Elektroforesis

#### a. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam proses elektroforesis gel agarosa meliputi *agarose SeaKem® LE Agarose* (Lonza, Walkersville, AS), *buffer TAE 1X* (Tris-Acetate-EDTA), *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan), sampel DNA hasil amplifikasi PCR, dan DNA marker *Sizer™-100 DNA Marker* (iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan) dengan ukuran 100–1500 bp. Alat yang digunakan meliputi neraca analitik, gelas ukur, erlenmeyer atau botol tahan panas, *hot plate*, cetakan gel agarosa dan sisir, mikropipet, mikrotip, power supply elektroforesis, alat elektroforesis Mupid-exU (Mupid, Tokyo, Jepang), serta gel *documentation system* (Gel Doc).

#### b. Prosedur Kerja

- Ditimbang *SeaKem® LE Agarose* (Lonza, Walkersville, AS) sebanyak 0,6 g, kemudian dilarutkan dalam buffer TAE 1X hingga mencapai volume akhir 40 mL.
- Campuran dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga larutan menjadi homogen dan jernih.
- Setelah didiamkan selama  $\pm 10$  menit, ditambahkan 2,5  $\mu\text{L}$  *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan), kemudian dihomogenkan dalam kondisi terlindung dari cahaya.
- Larutan agarose dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir, kemudian dibiarkan hingga memadat pada suhu ruang dalam kondisi terlindung dari cahaya.

- Gel agarosa yang telah memadat ditempatkan ke dalam elektroforesis cell.
- Buffer TAE 1X dimasukkan ke dalam elektroforesis cell pada alat Mupid-exU (Mupid, Tokyo, Jepang) hingga seluruh permukaan gel terendam.
- Sebanyak 4  $\mu$ L sampel DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran gel.
- Sebanyak 7  $\mu$ L DNA marker Sizer™-100 DNA Marker (iNtRON, Seongnam-si, Korea Selatan) berukuran 100–1500 bp dimasukkan ke dalam salah satu sumuran pada sisi ujung gel sebagai penanda ukuran fragmen DNA.
- Elektroforesis dijalankan dengan menghubungkan alat ke *power supply*.
- Tegangan diatur sebesar 100 V dengan waktu running selama 25 menit.
- Tombol run ditekan untuk memulai proses elektroforesis.
- Setelah proses selesai, gel agarosa diangkat dari elektroforesis cell.
- Gel kemudian ditempatkan pada *gel documentation system* (Gel Doc).
- Gel Doc dihubungkan dengan sumber listrik untuk proses visualisasi.
- Pita DNA yang terbentuk diamati dan didokumentasikan.

### 3.6.3.5 Analisis metagenomik berbasis *Next Generation Sequencing* (NGS) Generasi Ketiga

Hasil ekstraksi DNA yang sudah terverifikasi oleh proses PCR dan elektroforesis, baik dari darah bayi prematur sehat dan juga pada bayi SNAD yang juga menunjukkan hasil kultur darah negatif dipilih secara *purposive* masing-masing sebanyak 3 sampel untuk dilakukan analisis metagenomik bakteri menggunakan teknologi NGS berbasis *Oxford Nanopore Technologies* (ONT). *Sequencing* dilakukan melalui bantuan jasa 1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific, Malaysia melalui jasa dari PT. Genetika Science. Penggunaan jumlah sampel yang terbatas pada penelitian ini, merupakan pendekatan yang lazim dalam studi eksploratif atau *pilot study* (Charalampous *et al.*, 2019). Hal ini disebabkan oleh kompleksitas teknis, kebutuhan kualitas DNA yang tinggi, serta biaya analisis yang relatif besar dibandingkan metode konvensional. Oleh karena itu, banyak penelitian awal dalam bidang metagenomik menggunakan jumlah sampel yang kecil dengan tujuan untuk mengevaluasi kelayakan (*feasibility*), sensitivitas deteksi patogen, serta validitas metode sebelum dilakukan studi

dengan skala yang lebih besar. Penggunaan sampel terbatas ditujukan pada populasi khusus seperti bayi prematur dengan sepsis awitan dini. Hal ini disebabkan oleh keterbatasan klinis dan etik dalam pengambilan sampel darah pada bayi prematur, di mana volume darah yang dapat diambil sangat terbatas serta berisiko menyebabkan anemia iatrogenik dan instabilitas hemodinamik (Quince *et al.*, 2017).

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan sampel kecil dalam analisis metagenomik tetap dapat menghasilkan temuan yang valid. Penelitian oleh (Charalampous *et al.*, 2019) menggunakan pendekatan *nanopore metagenomics* pada jumlah sampel terbatas untuk diagnosis infeksi bakteri, dan berhasil mengidentifikasi patogen secara cepat dengan akurasi yang tinggi dibandingkan metode konvensional. Selain itu, studi oleh Wilson *et al.* (2014) pada kasus infeksi sistem saraf pusat menggunakan *metagenomic sequencing* pada jumlah pasien yang sangat terbatas (bahkan studi kasus tunggal), namun mampu mengidentifikasi etiologi infeksi yang tidak terdeteksi dengan metode rutin (Wilson *et al.*, 2014)

Dalam konteks neonatal, penelitian oleh Sim *et al.* (2015) yang menganalisis mikrobioma pada bayi prematur menggunakan jumlah sampel relatif kecil tetap mampu menunjukkan pola disbiosis yang bermakna secara biologis dan berhubungan dengan kejadian penyakit. Hal ini menunjukkan bahwa dalam penelitian berbasis molekuler, validitas tidak hanya ditentukan oleh jumlah sampel, tetapi juga oleh kedalaman analisis molekuler dan kualitas data sequencing (Quince *et al.*, 2017).

Pemilihan sampel secara *purposive* dalam penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang dianalisis telah memenuhi kriteria kualitas, yaitu telah terverifikasi melalui proses PCR dan elektroforesis, sehingga memiliki integritas DNA yang baik untuk analisis NGS. Strategi ini penting karena keberhasilan sequencing sangat bergantung pada kualitas DNA, sehingga seleksi sampel secara ketat dapat meningkatkan reliabilitas hasil (Quince *et al.*, 2017)

Dengan demikian, penggunaan *purposive sampling* dengan jumlah sampel kecil dalam penelitian ini memiliki dasar metodologis yang kuat dan didukung oleh penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa analisis metagenomik tetap

dapat memberikan hasil yang valid dan bermakna secara klinis. Prosedur pemeriksaan analisis metagenomik berbasis NGS-ONT sebagai berikut:

#### A. Prosedur Kerja

Pemeriksaan kualitas sampel (*quality control*)

Tahapan diawali dengan pemeriksaan kualitas sampel (*quality control*) yang dilakukan oleh PT. Genetika Science untuk memastikan sampel DNA yang dikirimkan memenuhi standar yang diperlukan untuk proses sekuensing. Tahapan prosesnya yaitu meliputi :

- Pengukuran awal konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan menggunakan Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, AS) berdasarkan nilai absorbansi untuk mengevaluasi kualitas DNA hasil ekstraksi, konsentrasi juga diukur menggunakan Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, AS).
- DNA genom kemudian diamplifikasi menggunakan Phusion™ Plus PCR Master Mix (F631L) (ThermoFisher Scientific, Waltham, AS) untuk memperbanyak fragmen DNA target dengan menargetkan gen 16S rRNA (*primer forward* (63F) dan *reverse* (1387R) yang turut dikirimkan bersama sampel DNA hasil ekstraksi).
- Produk PCR selanjutnya divisualisasikan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa untuk memastikan keberhasilan amplifikasi dan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan.
- Kuantifikasi DNA secara akurat dilakukan menggunakan Qubit dsDNA HS Assay Kit ((ThermoFisher Scientific, Waltham, AS).

#### 2. Persiapan pustaka (*library preparation*)

Sampel yang sudah lolos tahapan kualitas sampel (*quality control*) kemudian dikirimkan oleh PT. Genetika Science ke jasa sekuensing Apical Scientific, Malaysia. Tahapan diawali dengan persiapan pustaka (*library preparation*) dengan kit dari *Oxford Nanopore Technology* (Oxford, Inggris) sebagai berikut:

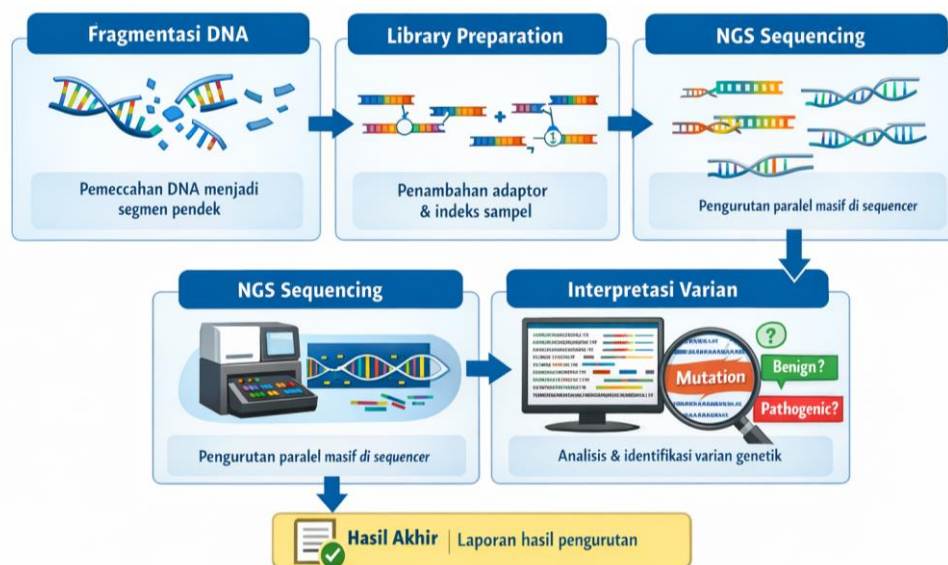
- Persiapan pustaka dimulai dengan amplifikasi fragmen DNA target menggunakan primer gen 16S rRNA (Bahram *et al.*, 2018).
- Produk amplifikasi kemudian mengalami proses perbaikan ujung DNA (*end repair*) untuk menyempurnakan struktur ujung fragmen sehingga memungkinkan ligasi dengan adapter sekuensing (Xie *et al.*, 2025).

- Setelah proses perbaikan ujung, dilakukan ligasi *barcode* spesifik pada setiap fragmen DNA. *Barcode* ini berfungsi sebagai penanda unik untuk membedakan masing-masing sampel selama proses sekuensing (Mäki *et al.*, 2016).
- Tahap akhir dari persiapan pustaka adalah ligasi adapter sekuensing, yaitu oligonukleotida pendek yang melekat pada fragmen DNA dan berperan dalam pengikatan fragmen DNA ke *flowcell* serta mendukung proses pembacaan selama sekuensing (Gunter *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2025).

#### B. *Next Generation Sequencing* berbasis *Oxford Nanopore Technology*

- Proses sekuensing dilakukan menggunakan platform *Nanopore* yang dioperasikan melalui perangkat lunak *MinKNOW* versi 24.02.16 (Tyler *et al.*, 2018).
- Selanjutnya dilakukan proses *basecalling* menggunakan perangkat lunak Dorado versi 7.3.11 dengan model *high-accuracy* untuk mengonversi sinyal mentah menjadi data urutan basa DNA (Wick *et al.*, 2019).
- File hasil sekuensing dalam format FASTQ kemudian dievaluasi kualitasnya menggunakan *NanoPlot* (De Coster, 2018).
- Penyaringan kualitas data dilakukan menggunakan *NanoFilt* untuk memperoleh data dengan tingkat akurasi yang tinggi (Nygaard *et al.*, 2020).
- Data hasil penyaringan kemudian diklasifikasikan secara taksonomi menggunakan perangkat lunak *Centrifuge* (Kim *et al.*, 2016), yang menghasilkan informasi berupa nama takson, kode taksonomi (taxID), tingkat taksonomi (*taxRank*), dan jumlah pembacaan unik (*numUniqueReads*).
- Basis data referensi yang digunakan dalam proses klasifikasi adalah NCBI 16S *RefSeq database* yang mencakup sekuen bakteri dan archaea (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/>).
- Analisis lanjutan dan visualisasi data dilakukan menggunakan *Pavian* (Breitwieser & Salzberg, 2016) dan *Krona Tools* (Terrón-Camero *et al.*, 2022).
- Analisis statistik tambahan, termasuk pembuatan diagram *Venn* dan *analisis  $\beta$ -diversity* melalui *Principal Coordinate Analysis* (PCoA), dilakukan menggunakan perangkat lunak RStudio versi 4.3.3 (Teufer *et al.*, 2025; Shi *et al.*, 2020).

Ilustrasi tahapan pemeriksaan NGS-ONT ditunjukkan oleh **Gambar 4**.



**Gambar 5** Diagram Alur Tahapan Pemeriksaan NGS-ONT (*Agudelo-Pérez et al., 2023*)

**Tabel 10.** Tahapan Pemeriksaan NGS-ONT

Tahapan	Keterangan
Fragmentasi DNA	Pemecahan DNA target menjadi segmen pendek ( $\pm 100\text{--}300$ bp) menggunakan metode mekanik (AFA/Covaris) atau enzimatis.
Seleksi Target (Opsional)	Segmen DNA target dipilih menggunakan probe (hibridisasi) atau amplifikasi PCR (amplicon).
Library Preparation	Penambahan adaptor dan indeks sampel pada fragmen DNA agar dapat dikenali dan disekuensing secara paralel.
NGS Sequencing (ONT)	Pengurutan DNA secara paralel menggunakan platform Oxford Nanopore Technology (ONT).
Base Calling (Analisis Primer)	Konversi sinyal mentah menjadi urutan basa DNA serta penilaian kualitas data.
Alignment (Analisis Sekunder)	Penyelarasan urutan DNA dengan genom referensi untuk identifikasi kesesuaian.
Variant Calling (Analisis Tersier)	Identifikasi varian/mutasi genetik dari hasil sequencing.
Anotasi & Interpretasi	Penentuan makna biologis/klinis dari varian yang ditemukan.
Hasil Akhir	Laporan hasil sequencing dan interpretasi untuk pengguna.

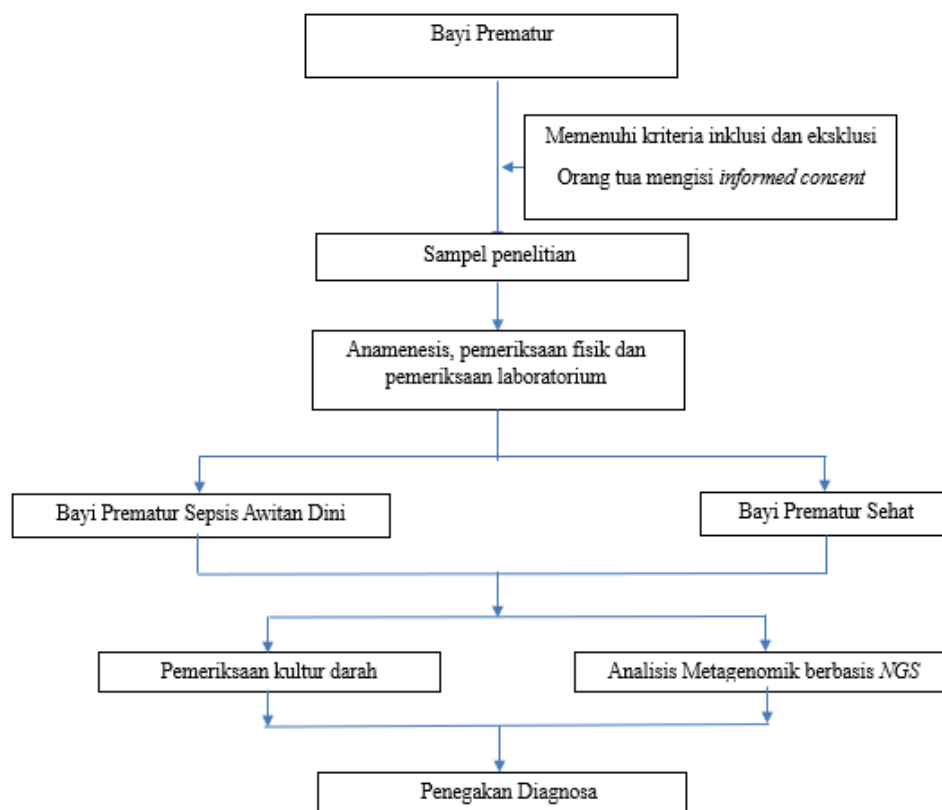
### 3.7 Proses analisa data

Analisis data metagenomik hasil sekuensing pada penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi keragaman bakteri, menentukan persentase kemunculan bakteri, serta melihat clustering taksonomi bakteri dalam Proses analisis dilakukan dengan membandingkan data sekuens terhadap database 16s RefSeq bakteri pada

*website* NCBI. Visualisasi dan interpretasi data selanjutnya dilakukan menggunakan beberapa perangkat lunak bioinformatika, yaitu Pavian untuk eksplorasi dan klasifikasi taksonomi, Krona Tools untuk visualisasi keragaman bakteri secara hierarkis, serta RStudio versi 4.2.0 untuk analisis statistik dan pengolahan data lanjutan.

### 3.8 Alur Penelitian

Alur penelitian dilakukan dengan langkah pada **Gambar 6** berikut ini:

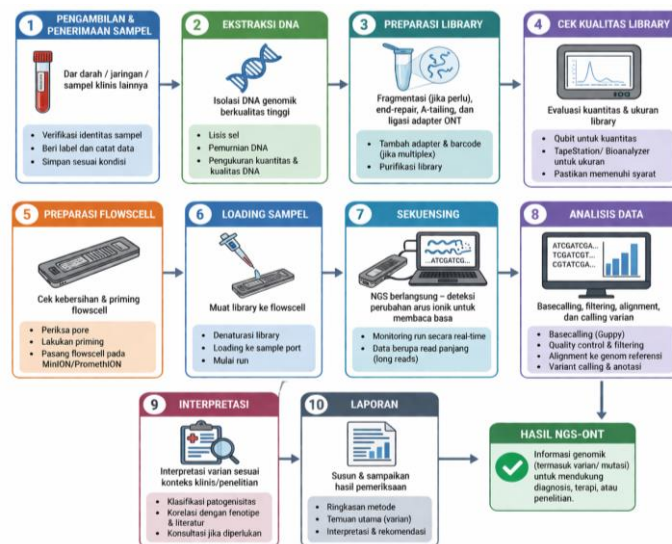


**Gambar 6.** Alur Penelitian

Penelitian diawali dengan pemilihan subjek berupa bayi prematur yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Setelah orang tua atau wali memberikan *informed consent*, subjek dimasukkan sebagai sampel penelitian. Selanjutnya, seluruh sampel menjalani anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium awal untuk menilai kondisi klinis neonatus serta menentukan kemungkinan adanya sepsis awitan dini. Berdasarkan hasil evaluasi klinis dan laboratorik tersebut, subjek kemudian dibagi menjadi dua kelompok,

yaitu kelompok bayi prematur dengan sepsis awitan dini dan kelompok bayi prematur sehat sebagai kontrol.

Pada kedua kelompok dilakukan pemeriksaan kultur darah serta analisis metagenomik berbasis *next-generation sequencing* (NGS). Pemeriksaan kultur darah digunakan sebagai metode konvensional untuk identifikasi bakteri patogen, sedangkan analisis metagenomik berbasis NGS digunakan untuk mendeteksi materi genetik mikroorganisme secara langsung dari sampel darah. Hasil kedua pemeriksaan tersebut kemudian dianalisis dan dibandingkan untuk mendukung penegakan diagnosis serta mengevaluasi potensi penggunaan pendekatan metagenomik berbasis NGS dalam identifikasi bakteri patogen pada bayi prematur dengan sepsis awitan dini.



**Gambar 7.** Diagram Alur Pemeriksaan NGS-ONT (Wang *et al.*, 2021)

**Gambar 7.** menunjukkan alur kerja pemeriksaan *next-generation sequencing* berbasis *Oxford Nanopore Technologies* (NGS-ONT) mulai dari pengambilan sampel hingga interpretasi hasil. Tahapan pertama dimulai dengan pengambilan dan penyimpanan sampel biologis seperti darah atau jaringan menggunakan tabung steril. Sampel kemudian menjalani proses ekstraksi DNA untuk memperoleh DNA genomik dengan kualitas dan kemurnian yang baik. Setelah itu dilakukan preparasi *library*, yaitu proses fragmentasi DNA, *end repair*, dan penambahan adaptor atau barcode agar fragmen DNA dapat dikenali oleh sistem sekuensing. Kualitas dan ukuran *library* selanjutnya dievaluasi

menggunakan instrumen seperti Qubit, TapeStation, atau Bioanalyzer untuk memastikan fragmen DNA memenuhi standar sebelum proses sekuensing dilakukan (Wang *et al.*, 2021).

Tahap berikutnya adalah persiapan *flowcell* dan *loading sample* ke perangkat sekuensing. Setelah sampel dimasukkan, proses sekuensing dilakukan menggunakan teknologi nanopore yang membaca perubahan sinyal listrik saat molekul DNA melewati pori biologis (*nanopore*). Data mentah hasil sekuensing kemudian dianalisis melalui proses bioinformatika yang meliputi *basecalling*, *trimming*, *alignment*, *variant calling*, dan anotasi genomik. Tahap akhir berupa interpretasi hasil untuk menentukan signifikansi biologis maupun klinis dari varian atau mikroorganisme yang terdeteksi. Hasil analisis selanjutnya disusun dalam bentuk laporan yang digunakan untuk mendukung diagnosis, terapi, maupun evaluasi klinis pasien. Workflow ini menggambarkan bahwa teknologi NGS-ONT memungkinkan identifikasi genomik secara cepat, paralel, dan komprehensif dalam satu rangkaian pemeriksaan (Wang *et al.*, 2021).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Karakteristik bayi prematur sehat dengan bayi prematur sepsis awitan dini meliputi berat badan lahir lebih rendah, skor APGAR lebih rendah, usia gestasi lebih muda, dan usia ibu lebih tua.
2. Tidak ditemukan bakteri patogen yang dapat diidentifikasi melalui pemeriksaan kultur darah pada bayi prematur sehat dan bayi prematur dengan sepsis awitan dini, karena seluruh sampel darah menunjukkan hasil kultur steril tanpa adanya pertumbuhan mikroorganisme.
3. Tidak ditemukan bakteri yang dapat diidentifikasi melalui analisis metagenomik berbasis NGS-ONT pada bayi prematur sehat sehingga tidak dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing, sementara hasil analisis metagenomik berbasis NGS-ONT berhasil mengidentifikasi beberapa spesies bakteri pada sampel darah bayi prematur dengan sepsis awitan dini, spesies terbanyak berdasarkan hubungan antar sampel yaitu *Cutibacterium acnes*, *Paracoccus marcusii*, *Moraxella osloensis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas sihuiensis*, *Ectopseudomonas guuguanensis*, *Janibacter massiliensis*, *Stutzerimonas stutzeri*, dan *Thalassoporum komareki*.
4. Analisis metagenomik berbasis NGS-ONT memiliki potensi kemampuan deteksi patogen yang secara signifikan lebih tajam dan sensitif dalam membedakan kondisi infeksi pada neonatus dibandingkan dengan metode kultur darah konvensional, karena mampu mendeteksi keberadaan DNA bakteri pada sampel dengan hasil kultur darah negatif serta memberikan gambaran keragaman komunitas mikroba secara lebih komprehensif.

### 5.2 Saran

1. Dilakukan penelitian lanjutan dengan kultur selektif atau PCR spesifik untuk spesies-spesies yang diketahui sering terkait dengan infeksi nosokomial dan

memiliki resistensi obat (pada sampel darah, jaringan, atau lingkungan rumah sakit

2. Dilakukan penelitian dengan pengambilan sampel (swab) dari permukaan unit NICU (inkubator, peralatan medis, gagang pintu), cairan infus, dan tangan staf medis untuk diuji dengan NGS dan/atau kultur.
3. Dilakukan studi dengan jumlah sampel yang lebih besar dan multisenter untuk mengkorelasikan hasil metagenomik (DNA bakteri) dengan parameter klinis sepsis (misalnya, peningkatan CRP, *procalcitonin*, skor *Sepsis Neonatal*), respons terhadap antibiotik, dan hasil luaran pasien (morbiditas/mortalitas).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelrahman, S. T., Kamal, N. M., Abdelbar, S. M. M., Al Juhmani, R., Onyejesi, C. D., Attalla, A., & Alsabri, M. (2025). Neonatal Sepsis in Low-Resource Emergency Settings: Evidence-Based Strategies for Early Recognition and Management. In *Sage Open Pediatrics*. <https://doi.org/10.1177/30502225251380322>
- Agudelo-Pérez, S., Fernández-Sarmiento, J., Rivera León, D., & Peláez, R. G. (2023). Metagenomics by next-generation sequencing (mNGS) in the etiological characterization of neonatal and pediatric sepsis: A systematic review. In *Frontiers in Pediatrics*. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1011723>
- Amanda Jaya, I. G., Bikin Suryawan, I. W., & Pramitha Rahayu, P. (2019). Hubungan prematuritas dengan kejadian sepsis neonatorum yang dirawat di ruang perinatologi dan neonatal intensive care unit (NICU) RSUD Wangaya kota Denpasar. *Intisari Sains Medis*. <https://doi.org/10.15562/ism.v10i1.319>
- Anastasia. (2017). Laporan Kasus: Sepsis Neonatorum Awitan Dini. *Cermin Dunia Kedokteran*.
- Araújo, B. C., & Guimarães, H. (2020). Risk factors for neonatal sepsis: an overview. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*. <https://doi.org/10.7363/090206>
- Ariyanti, Y., & Sianturi, S. (2019). Ekstraksi DNA total dari sumber jaringan hewan (Ikan Kerapu) menggunakan metode kit for animal tissue. *Journal of Science and Applicative Technology*. <https://doi.org/10.35472/jsat.v3i1.111>
- Balks, J., Grumaz, S., Mazzitelli, S., Neder, U., Lemloh, L., Melaku, T., Glaser, K., Mueller, A., & Kipfmueller, F. (2025). Microbial cell-free DNA-sequencing as an addition to conventional diagnostics in neonatal sepsis. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/s41390-024-03448-1>
- Beck, C., Gallagher, K., Taylor, L. A., Goldstein, J. A., Mithal, L. B., & Gernand, A. D. (2021). Chorioamnionitis and Risk for Maternal and Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004377>

- Belachew, A., & Tewabe, T. (2020). Neonatal sepsis and its association with birth weight and gestational age among admitted neonates in Ethiopia: Systematic review and meta-analysis. *BMC Pediatrics*. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1949-x>
- Berardi, A., Rossi, C., Spada, C., Vellani, G., Guidotti, I., Lanzoni, A., Azzalli, M., Papa, I., Giugno, C., & Lucaccioni, L. (2019). Strategies for preventing early-onset sepsis and for managing neonates at-risk: Wide variability across six Western countries. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1454423>
- Bhardwaj, R., Agrawal, U., Vashist, P., & Manna, S. (2024). Determination of sample size for various study designs in medical research: A practical primer. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. [https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe\\_1675\\_23](https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_1675_23)
- Blauwkamp, T. A., Thair, S., Rosen, M. J., Blair, L., Lindner, M. S., Vilfan, I. D., Kawli, T., Christians, F. C., Venkatasubrahmanyam, S., Wall, G. D., Cheung, A., Rogers, Z. N., Meshulam-Simon, G., Huijse, L., Balakrishnan, S., Quinn, J. V., Hollemon, D., Hong, D. K., Vaughn, M. L., Yang, S. (2019). Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0349-6>
- Bodor, A., Bounedjoun, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- Botan, A., Campisciano, G., Zerbato, V., Di Bella, S., Simonetti, O., Busetti, M., Toc, D. A., Luzzati, R., & Comar, M. (2024). Performance of 16S rRNA Gene Next-Generation Sequencing and the Culture Method in the Detection of Bacteria in Clinical Specimens. *Diagnostics*. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14131318>
- Brenner, T., Decker, S. O., Vainshtein, Y., Grumaz, S., Manoochchri, M., FeiBt, M., Seidel-Glätzer, A., Pletz, M. W., Bracht, H., Berger, M. M., Fuest, K.,

- Blobner, M., Bach, F., Moerer, O., Brandenburger, T., Dimski, T., Suchodolski, K., Jäkel, U., Zischkau, J., Gillmann, H. J. (2025). Improved pathogen identification in sepsis or septic shock by clinical metagenomic sequencing. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2025.106565>
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica*. <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Cantey, J. B., & Baird, S. D. (2017). Ending the culture of culture-negative sepsis in the neonatal ICU. In *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0044>
- Cao, X. G., Zhou, S. S., Wang, C. Y., Jin, K., & Meng, H. D. (2022). The diagnostic value of next-generation sequencing technology in sepsis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.899508>
- Cernava, T., Chen, X., Krug, L., Li, H., Yang, M., & Berg, G. (2019). The tea leaf microbiome shows specific responses to chemical pesticides and biocontrol applications. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.319>
- Cha, T., Kim, H. H., Keum, J., Kwak, M. J., Park, J. Y., Hoh, J. K., Kim, C. R., Jeon, B. H., & Park, H. K. (2023). Gut microbiome profiling of neonates using Nanopore MinION and Illumina MiSeq sequencing. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1148466>
- Chaemsaitong, P., Romero, R., Pongchaikul, P., Warintaksa, P., Mongkolsuk, P., Bhuwathanapun, M., Kotchompoo, K., Nimsamer, P., Kruasuwan, W., Amnuaykiatlert, O., Vivithanaporn, P., Meyyazhagan, A., Awonuga, A., Settacomkul, R., Singhsnaeh, A., Laolerd, W., Santanirand, P., Thaipisuttikul, I., Wongsurawat, T., & Jenjaroenpun, P. (2025). The rapid diagnosis of intraamniotic infection with nanopore sequencing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2025.02.011>
- Charalampous, T., Kay, G. L., Richardson, H., Aydin, A., Baldan, R., Jeanes, C.,

- Rae, D., Grundy, S., Turner, D. J., Wain, J., Leggett, R. M., Livermore, D. M., & O'Grady, J. (2019). Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0156-5>
- Chen, L., Zhao, Y., Wei, J., Huang, W., Ma, Y., Yang, X., Liu, Y., Wang, J., Xia, H., & Lou, Z. (2022). Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Neonatal Infectious Diseases. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01195-22>
- Chicco, D., Sichenze, A., & Jurman, G. (2025). A simple guide to the use of Student's t-test, Mann-Whitney U test, Chi-squared test, and Kruskal-Wallis test in biostatistics. *BioData Mining*. <https://doi.org/10.1186/s13040-025-00465-6>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. In *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- Coggins, S. A., & Glaser, K. (2022). Updates in Late-Onset Sepsis: Risk Assessment, Therapy, and Outcomes. In *NeoReviews*. <https://doi.org/10.1542/neo.23-10-e738>
- De Rose, D. U., Ronchetti, M. P., Martini, L., Rechichi, J., Iannetta, M., Dotta, A., & Auriti, C. (2024). Diagnosis and Management of Neonatal Bacterial Sepsis: Current Challenges and Future Perspectives. In *Tropical Medicine and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9090199>
- Deurenberg, R. H., Bathorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Raangs, E. C., Rosema, S., Veloo, A. C. M., Zhou, K., Friedrich, A. W., & Rossen, J. W. A. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>
- Dornelles, L. V., Procianoy, R. S., Roesch, L. F. W., Corso, A. L., Dobbler, P. T., Mai, V., & Silveira, R. C. (2022). Meconium microbiota predicts clinical early-onset neonatal sepsis in preterm neonates. *Journal of Maternal-Fetal*

- and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1774870>
- Dréno, B., Bettoli, V., Araviiskaia, E., Sanchez Viera, M., & Bouloc, A. (2018). The influence of exposome on acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. <https://doi.org/10.1111/jdv.14820>
- Eamsakulrat, P., Santanirand, P., & Phuphuakrat, A. (2022). Diagnostic Yield and Impact on Antimicrobial Management of 16S rRNA Testing of Clinical Specimens. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02094-22>
- Ervina, L., Busman, H., Berawi, K., Irawan, B., Azizah, N., & Yolanda, J. E. (2025). Bacterial patterns and antibiotic sensitivity among neonatal sepsis patients in Dr. H. Abdul Moeloek Hospital, Lampung. *Paediatrica Indonesiana(Paediatrica Indonesiana)*. <https://doi.org/10.14238/pi65.4.2025.297-306>
- Fan, X., Chen, F., Ruan, Z., & Li, L. (2025). Therapeutic challenges in managing *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection in a renal dysfunction patient: a case study and literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1694228>
- Firmansyah, M. E., Rukmono, P., Purwaningrum, R., & Octarianingsih, F. (2023). Hubungan Bayi Berat Badan Lahir Rendah (BBLR) Dengan Terjadinya Sepsis Neonatorum Di Rsud Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*. <https://doi.org/10.33024/jikk.v10i8.9715>
- Flannery, D. D., Edwards, E. M., Puopolo, K. M., & Horbar, J. D. (2021). Early-onset sepsis among very preterm infants. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2021-052456>
- Fleischmann-Struzek, C., Goldfarb, D. M., Schlattmann, P., Schlapbach, L. J., Reinhart, K., & Kisson, N. (2018). The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. In *The Lancet Respiratory Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30063-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8)
- Gautam, A. (2022). *DNA Isolation by Lysozyme and Proteinase K*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_11)
- Glaser, M. A., Hughes, L. M., Jnah, A., Newberry, D., & Harris-Haman, P. A.

- (2021). Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies. In *Advances in Neonatal Care*. <https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000769>
- Grumaz, S., Stevens, P., Grumaz, C., Decker, S. O., Weigand, M. A., Hofer, S., Brenner, T., von Haeseler, A., & Sohn, K. (2016). Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0326-8>
- Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- Hariyadi S, Narulita E, & Rais MA. (2018). Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Proceeding Biology Education Conference*.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hicks, L., M. van der Graa, C., Childress, J., Cook, E., Schmidt, K., Rosenzweig, F., & Kroll, E. (2018). Streamlined preparation of genomic DNA in agarose plugs for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Biological Methods*. <https://doi.org/10.14440/jbm.2018.218>
- Hobbs, K. J., Cooper, B. L., Dembek, K., & Sheats, M. K. (2024). Investigation of Extracted Plasma Cell-Free DNA as a Biomarker in Foals with Sepsis. *Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.3390/vetsci11080346>
- Horcajada, J. P., Edwards, F., Fonio, S., Montero, M., Harris, P., Paterson, D. L., & Laupland, K. B. (2024). *Pseudomonas stutzeri* bloodstream infection is a prevailing community-onset disease with important mortality rates: results from a retrospective observational study in Australia. *Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1080/23744235.2024.2333979>
- Hu, S., Li, X., Yin, X., Li, R., Zhang, R., Zang, J., & Liu, Y. (2022). Species-specific identification of *Pseudomonas* based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer (ITS) and its combined application with next-generation sequencing. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/s12866->

022-02607-w

- Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H. E., Pedersen, B. S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A. R., ... Loose, M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
- Jansson, L., Aili Fagerholm, S., Börkén, E., Hedén Gynnå, A., Sidstedt, M., Forsberg, C., Ansell, R., Hedman, J., & Tillmar, A. (2024). Assessment of DNA quality for whole genome library preparation. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115636>
- Jayarajan, S., Srinivasan, R., Boppe, A., & Kannappan, S. (2025). Changing Trends in Microbiological and Antibiogram Profile of Bacterial Bloodstream Infection in Neonates: A Retrospective Descriptive Study. *Journal of Neonatology*. <https://doi.org/10.1177/09732179251337266>
- Ji, H., Yu, Y., Huang, L., Kou, Y., Liu, X., Li, S., Zhang, Y., Li, Z., Sun, X., Wang, J., Yang, K., Zhou, L., Luo, Y., Zhao, G., Yang, Z., Zhang, X., Cui, X., Li, J., Wang, Y., Wang, X. (2022). Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance of Early Onset Sepsis in Very Premature Infants: A Real-World Study. *Infectious Diseases and Therapy*. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00688-8>
- Jing, Q., Leung, C. H. C., & Wu, A. R. (2022). Cell-Free DNA as Biomarker for Sepsis by Integration of Microbial and Host Information. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac097>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Joubert, I. A., Otto, M., Strunk, T., & Currie, A. J. (2022). Look Who's Talking: Host and Pathogen Drivers of *Staphylococcus epidermidis* Virulence in Neonatal Sepsis. In *International Journal of Molecular Sciences*.

<https://doi.org/10.3390/ijms23020860>

- Kaplan, J. B., Assa, M., Mruwat, N., Sailer, M., Regmi, S., & Kridin, K. (2024). Facultatively Anaerobic Staphylococci Enable Anaerobic Cutibacterium Species to Grow and Form Biofilms Under Aerobic Conditions. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122601>
- Kariniotaki, C., Thomou, C., Gkentzi, D., Panteris, E., Dimitriou, G., & Hatzidaki, E. (2025). Neonatal Sepsis: A Comprehensive Review. In *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010006>
- Karmila, A., Barchia, I., Ramandati, A., & Zhang, L. (2022). Clinical and bacteriological profile of culture-negative and culture-proven neonatal sepsis in Palembang, Indonesia. *Journal of Infection in Developing Countries*. <https://doi.org/10.3855/jidc.14638>
- Kašička, V. (2025). Recent Developments in Capillary and Microchip Electro-separations of Peptides (2023–mid 2025). In *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.70052>
- Kayatani, A. K. K., Leke, R. G. F., Leke, R. I. J., Fogako, J., & Taylor, D. W. (2022). Transplacental transfer of total immunoglobulin G and antibodies to Plasmodium falciparum antigens between the 24th week of gestation and term. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21908-8>
- Klingenberg, C., Kornelisse, R. F., Buonocore, G., Maier, R. F., & Stocker, M. (2020). Culture-negative early-onset neonatal sepsis: at the crossroad between efficient sepsis care and antimicrobial stewardship. *Neonatology*. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00285>
- Lalezari, A., Cohen, M. J., Svinik, O., Tel-Zur, O., Sinvani, S., Al-Dayem, Y. A., Block, C., Moses, A. E., Oster, Y., Salameh, S., & Strahilevitz, J. (2020). A simplified blood culture sampling protocol for reducing contamination and costs: a randomized controlled trial. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.005>
- Lee, C. C., & Chiu, C. H. (2024). Link between gut microbiota and neonatal sepsis. In *Journal of the Formosan Medical Association*. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2023.09.019>
- Leinberger, J., Holste, J., Bunk, B., Freese, H. M., Spröer, C., Dlugosch, L., Kück,

- A. C., Schulz, S., & Brinkhoff, T. (2021). High Potential for Secondary Metabolite Production of *Paracoccus marcusii* CP157, Isolated From the Crustacean *Cancer pagurus*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.688754>
- Li, Z., Zhang, P., Yang, B., Liu, J., Xi, H., Zhang, D., & Yamaguchi, Y. (2021). High throughput DNA concentration determination system based on fluorescence technology. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128904>
- Liu, C., Fang, C., He, Q., & Xie, L. (2020). The value of interleukin-6 (IL-6) within 6 hours after birth in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Translational Pediatrics*. <https://doi.org/10.21037/TP-20-239>
- Liu, Y., Deng, N., Lu, Y., Peng, J., & Yuan, S. (2025). Comparison of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) technology with routine laboratory culture for bacterial and fungal detection in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Thoracic Disease*. <https://doi.org/10.21037/jtd-2025-1647>
- Ma, R., Luo, Y., Wang, J., Zhou, Y., Sun, H., Ren, X., Xu, Q., Zhang, L., & Zou, L. (2020). Ten-year time trends in preterm birth during a sociodemographic transition period: a retrospective cohort study in Shenzhen, China. *BMJ Open*. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-037266>
- Ma, R., Yin, Y., Zhang, J. P., Zhang, M. X., Zhou, J. R., He, Y., Gai, W., Zhang, X. H., Wang, Y., Xu, L. P., Liu, K. Y., Huang, X. J., & Sun, Y. Q. (2025). Metagenomic Next-generation Sequencing Compared With Blood Culture as First-line Diagnostic Method for Bloodstream Infection in Hematologic Patients With Febrile Neutropenia: A Multicenter, Prospective Study. *Open Forum Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaf288>
- Maaloum, M., Diop, K., Diop, A., Anani, H., Tomei, E., Richez, M., Rathored, J., Bretelle, F., Raoult, D., Fenollar, F., & Fournier, P. E. (2019). Description of *Janibacter massiliensis* sp. nov., cultured from the vaginal discharge of a patient with bacterial vaginosis. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01247-x>

- MacKenzie, M., & Argyropoulos, C. (2023). An Introduction to Nanopore Sequencing: Past, Present, and Future Considerations. In *Micromachines*. <https://doi.org/10.3390/mi14020459>
- Magi, A., Semeraro, R., Mingrino, A., Giusti, B., & D'Aurizio, R. (2017). Nanopore sequencing data analysis: State of the art, applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx062>
- Marsubrin, P. M. T., Medise, B. E., & Devaera, Y. (2023). Pertumbuhan dan Perkembangan Bayi Prematur Usia Gestasi 28-34 Minggu Pasca Rawat: Studi Kohort di Rumah Sakit Ciptomangunkusumo. *Sari Pediatri*. <https://doi.org/10.14238/sp25.4.2023.243-8>
- Maruyama, Y., Shigemura, T., Aoyama, K., Nagano, N., & Nakazawa, Y. (2018). Bacteremia due to *Moraxella osloensis*: a case report and literature review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.10.008>
- Mayslich, C., Grange, P. A., & Dupin, N. (2021). *Cutibacterium acnes* as an opportunistic pathogen: An update of its virulence-associated factors. In *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020303>
- Murthy, S., Godinho, M. A., Guddattu, V., Lewis, L. E. S., & Sreekumaran Nair, N. (2019). Risk factors of neonatal sepsis in India: A systematic review and meta-analysis. In *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215683>
- NICE Guidelines. (2021). Neonatal infection: antibiotics for prevention and treatment (NG195). *National Institute for Health and Care Excellence (NICE)*.
- Nuhan, H. G., & Mirawati. (2025). Factors Influencing the Incidence of Neonatal Sepsis In the Neonatal Intensive Care Unit, Budhi Asih Regional Hospital. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Perkotaan*. <https://doi.org/10.37012/jkmp.v5i2.3162>
- Nurdin, G. M., Patandjengi, B., & Kuswinanti, T. (2025). Comparative metagenomic analysis of rice phyllosphere bacterial communities under semi-organic and non-organic farming systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103695>
- Ocviyanti, D., & Wahono, W. T. (2018). Risk Factors for Neonatal Sepsis in

- Pregnant Women with Premature Rupture of the Membrane. *Journal of Pregnancy*. <https://doi.org/10.1155/2018/4823404>
- Okube, O. T., & Komen, M. (2020). Prevalence and Predictors of Neonatal Sepsis among Neonates Admitted at the Newborn Unit of Kenyatta National Hospital, Nairobi, Kenya. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.4236/ojog.2020.1090114>
- Overbeek, R., Leitl, C. J., Stoll, S. E., Wetsch, W. A., Kammerer, T., Mathes, A., Böttiger, B. W., Seifert, H., Hart, D., & Dusse, F. (2024). The Value of Next-Generation Sequencing in Diagnosis and Therapy of Critically Ill Patients with Suspected Bloodstream Infections: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm13020306>
- Panneflek, T. J. R., Hasperhoven, G. F., Chimwaza, Y., Allen, C., Lavin, T., te Pas, A. B., Bekker, V., & van den Akker, T. (2024). Intrapartum antibiotic prophylaxis to prevent Group B streptococcal infections in newborn infants: a systematic review and meta-analysis comparing various strategies. *EClinicalMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2024.102748>
- Pendleton, K. M., Erb-Downward, J. R., Bao, Y., Branton, W. R., Falkowski, N. R., Newton, D. W., Huffnagle, G. B., & Dickson, R. P. (2017). Rapid pathogen identification in bacterial pneumonia using real-time metagenomics. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0537LE>
- Pentzold, S., Li, M., Paz Hernandez, A. L., & Dahmen, U. (2025). Determination of residual DNA in decellularised aortas— towards fluorescence-based quantification of DNA purified by various methods. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10755-1>
- Procianoy, R. S., & Silveira, R. C. (2020). The challenges of neonatal sepsis management. In *Jornal de Pediatria*. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2019.10.004>
- Qi, Y., Lin, W. Q., Liao, B., Chen, J. W., & Chen, Z. S. (2023). Blood plasma metagenomic next-generation sequencing for identifying pathogens of febrile neutropenia in acute leukemia patients. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47685-6>

- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. In *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Rana, B., & Joshi, G. K. (2023). Electrophoresis: Basic principle, types, and applications. In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00011-8>
- Rodríguez-Riveiro, R., Velasco, A., & Sotelo, C. G. (2022). The Influence of DNA Extraction Methods on Species Identification. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods11121739>
- Salsabila, K., Toha, N. M. A., Rundjan, L., Pattanittum, P., Sirikarn, P., Rohsiswatmo, R., Wandita, S., Hakimi, M., Lumbiganon, P., Green, S., & Turner, T. (2022). Early-onset neonatal sepsis and antibiotic use in Indonesia: a descriptive, cross-sectional study. *BMC Public Health*. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13343-1>
- Saraf, A., Aleksovski, B., Blondet, E., Krstić, S., Criscuolo, A., & Gugger, M. (2025). Expanding species diversity in the monotypic genera *Thalassoporum* and *Tumidithrix* (Pseudanabaenales, Cyanobacteriota) with the description of *Thalassoporum mexicanum* sp. nov. and *Tumidithrix helvetica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006869>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. In *Biology*. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2024). Correction to: Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements (*Biology*, (2023), 12, 7, (997), 10.3390/biology12070997). In *Biology*. <https://doi.org/10.3390/biology13050286>
- Shane, A. L., Sánchez, P. J., & Stoll, B. J. (2017). Neonatal sepsis. In *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31002-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31002-4)
- Sharma, P., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2024). Biofertilizer and biocontrol

- properties of *Stenotrophomonas maltophilia* BCM emphasize its potential application for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1364807>
- Shehab El-Din, E. M. R., El-Sokkary, M. M. A., Bassiouny, M. R., & Hassan, R. (2015). Epidemiology of neonatal sepsis and implicated pathogens: A Study from Egypt. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/509484>
- Shi, W., Friedman, A. K., & Baker, L. A. (2017). Nanopore Sensing. In *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04260>
- Shi, Y., Zhang, L., Do, K. A., Peterson, C. B., & Jenq, R. R. (2020). APCoA: Covariate adjusted principal coordinates analysis. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa276>
- Singh, J., Lee, Y., & Kellum, J. A. (2022). A new perspective on NO pathway in sepsis and ADMA lowering as a potential therapeutic approach. *Critical Care*. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04075-0>
- Sowersby, D. S., & Lewis, L. K. (2024). SURE gel electrophoresis: A method for improved detection and purification of dilute nucleic acid samples. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115373>
- Stewart, C. J., Nelson, A., Treumann, A., Skeath, T., Cummings, S. P., Embleton, N. D., & Berrington, J. E. (2016). Metabolomic and proteomic analysis of serum from preterm infants with necrotising enterocolitis and late-onset sepsis. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.235>
- Stoll, B. J., Puopolo, K. M., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Bell, E. F., Carlo, W. A., Cotten, C. M., D'Angio, C. T., Kazzi, S. N. J., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., Hale, E. C., Collins, M. V., Das, A., Baker, C. J., Wyckoff, M. H., Yoder, B. A., Watterberg, K. L., Walsh, M. C., Higgins, R. D. (2020). Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies. *JAMA Pediatrics*. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.0593>
- Sun, L., Zhang, S., Yang, Z., Yang, F., Wang, Z., Li, H., Li, Y., & Sun, T. (2022). Clinical Application and Influencing Factor Analysis of Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in ICU Patients With Sepsis. *Frontiers in*

*Cellular and Infection Microbiology.*  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.905132>

- Suwarna, N. O., Yuniati, T., Cahyadi, A. I., Achmad, T. H., & Agustian, D. (2022). Faktor Risiko Kejadian Sepsis Neonatorum Awitan Dini di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Hasan Sadikin Bandung. *Sari Pediatri*. <https://doi.org/10.14238/sp24.2.2022.99-105>
- Sweeney, T. E., Wynn, J. L., Cernada, M., Serna, E., Wong, H. R., Baker, H. V., Vento, M., & Khatri, P. (2018). Validation of the sepsis metascore for diagnosis of neonatal sepsis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. <https://doi.org/10.1093/jpids/pix021>
- Tabah, A., De Waele, J., Ssi Yan Kai, N., Aslan, A. T., Buetti, N., Timsit, J. F., Ballard, E., Eriksson, L., Laupland, K. B., & Lipman, J. (2025). Source control in bloodstream infections in patients with sepsis, septic shock, or requiring ICU admission: a scoping review with recommendations for standardizing research. In *Intensive Care Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00134-025-08026-5>
- Taylor, J. F., & Riley, P. A. (2026). Principles of microscopy, culture and serology-based diagnostics. In *Medicine (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2025.10.009>
- Ter, S. K., Rattanavong, S., Roberts, T., Sengduangphachanh, A., Sihalath, S., Panapruksachat, S., Vongsouvath, M., Newton, P. N., Simpson, A. J. H., & Robinson, M. T. (2021). Molecular detection of pathogens in negative blood cultures in the Lao People's Democratic Republic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1348>
- Tourelle, K. M., Boutin, S., Weigand, M. A., & Schmitt, F. C. F. (2021). Sepsis and the human microbiome. Just another kind of organ failure? a review. In *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm10214831>
- Utomo, M. T., Sumitro, K. R., Etika, R., & Widodo, A. D. W. (2021). Current-proven neonatal sepsis in Indonesian tertiary neonatal intensive care unit: A hematological and microbiological profile. *Iranian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i3.6386>
- Van Der Poll, T., Van De Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P., & Netea, M. G.

- (2017). The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. In *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.36>
- Vander Haar, E. L., Wu, G., Gyamfi-Bannerman, C., Thomas, C., Wapner, R. J., Reddy, U. M., Zhao, L., Silver, R. M., Goldenberg, R. L., & Han, Y. W. (2022). Microbial Analysis of Umbilical Cord Blood Reveals Novel Pathogens Associated with Stillbirth and Early Preterm Birth. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.02036-22>
- Vasilescu, D. I., Dan, A. M., Stefan, L. A., Vasilescu, S. L., Dima, V., & Cîrstoiu, M. M. (2025). Assessment of Culture-Negative Neonatal Early-Onset Sepsis: Risk Factors and Utility of Currently Used Serum Biomarkers. *Children*. <https://doi.org/10.3390/children12030355>
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. In *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. In *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- Wilson, M. R., Naccache, S. N., Samayoa, E., Biagtan, M., Bashir, H., Yu, G., Salamat, S. M., Somasekar, S., Federman, S., Miller, S., Sokolic, R., Garabedian, E., Candotti, F., Buckley, R. H., Reed, K. D., Meyer, T. L., Seroogy, C. M., Galloway, R., Henderson, S. L., Chiu, C. Y. (2014). Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1401268>
- Wu, M., Wen, J., Chang, M., Yang, G., & Zhou, S. (2014). *Pseudomonas sihuiensis* sp. nov., isolated from a forest soil in South China. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0134-3>
- Yadav, N. S., Sharma, S., Chaudhary, D. K., Panthi, P., Pokhrel, P., Shrestha, A., & Mandal, P. K. (2018). Bacteriological profile of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates admitted at Kanti Children's Hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Research Notes*.

<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3394-6>

- Yan, D., Han, Y., Liu, J., Zan, S., Lu, Y., An, Z., & Capo, E. (2024). Metagenomic analysis of sedimentary archives reveals 'historical' antibiotic resistance genes diversity increased over recent decades in the environment. *Environmental Research Letters* . <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ad850a>
- Yan, G., Liu, J., Chen, W., Chen, Y., Cheng, Y., Tao, J., Cai, X., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, M., & Lu, G. (2021). Metagenomic Next-Generation Sequencing of Bloodstream Microbial Cell-Free Nucleic Acid in Children With Suspected Sepsis in Pediatric Intensive Care Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.665226>
- Yang, X. A., Hao, H., & Liao, C. (2023). Editorial: Next generation sequencing (NGS) for rare diseases diagnosis - Volume II. In *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1249585>
- Yoon, S. M., Ki, C. S., & Song, J. S. (2025). CleanSeqU algorithm for decontamination of catheterized urine 16S rRNA sequencing data. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98875-3>
- Youssef, N., Boutros, C. F., Dakroub, F., Akl, F., Reslan, L., Finianos, M., Moumneh, M. B. M., Dargham, T. B., Zein, Z. El, Haddara, A., Korman, R., Khafaja, S., Matar, G., Araj, G. F., & Dbaiibo, G. S. (2025). The clinical impact of 16S ribosomal RNA PCR and sequencing in the identification of bacterial infections: a 7-year report from a Lebanese tertiary care center. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1619640>
- Yu, H., Liang, D., Ding, X., Gao, H., Fan, G., Song, Y., Sun, S., Huang, Q., Liu, S., & Zhang, Z. (2025). Comparison of microbial culture, metagenomic next-generation sequencing and droplet digital polymerase chain reaction methods for pathogen detection in patients with neurosurgical central nervous system infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1606283>
- Zambri, H., Fetriyah, U. H., & Nito, P. J. B. (2021). The Relationship between Birth Weight and Neonatal Sepsis Incidence: Literature Review. *International Journal of Clinical Inventions and Medical Science*.

<https://doi.org/10.36079/lamintang.ijcims-0302.255>

Zhang, C., An, D., Xiao, Q., Chen, F. Q., Zhang, Y. H., Weng, H. F., & Xiao, A. F. (2021). Convenient agarose preparation with hydrogen peroxide and desulfation process analysis. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md19060297>

Zhou, Y., Shi, W., Wen, Y., Mao, E., & Ni, T. (2023). Comparison of pathogen detection consistency between metagenomic next-generation sequencing and blood culture in patients with suspected bloodstream infection. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36681-5>