

TESIS

**DETEKSI GEN RESISTENSI *GUIANA EXTENDED-SPECTRUM* (GES)
PADA ISOLAT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
DI RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO**

*DETECTION OF GUIANA EXTENDED-SPECTRUM (GES)
RESISTANCE GENES FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA
ISOLATES AT Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO HOSPITAL*

WAHYUNITA

P062191018



**MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**DETEKSI GEN RESISTENSI *GUIANA EXTENDED-SPECTRUM* (GES)
PADA ISOLAT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
DI RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi
Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

WAHYUNITA

Kepada

**MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

DETEKSI GEN RESISTENSI *GUIANA EXTENDED-SPECTRUM* (GES) PADA ISOLAT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DI RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO

Disusun dan diajukan oleh :

WAHYUNITA

Nomor Pokok: **P062191018**

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 7 Januari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D, Sp.MK

NIP: 1969 0918 1996 03 2001

dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK

NIP: 1977 1231 2002 12 1002

Ketua Program Studi
Ilmu Biomedik

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc
NIP: 1977 0121 2003 12 2003

Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc
NIP: 1967 0308 1990 03 1001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Wahyunita
Nomor Pokok : P062191018
Program Studi : Ilmu Biomedik
Konsentrasi : Mikrobiologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan dan pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan isi tesis ini merupakan hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 10 Januari 2022

Yang menyatakan,


Wahyunita

PRAKATA

Bismillaahirrahmaanirrahiim

Puji Syukur yang tak terhingga peneliti panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat dan Hidayah-Nya, serta salam dan salawat kepada Rasulullah Muhammad SAW sehingga peneliti dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “DETEKSI GEN RESISTENSI *GUIANA EXTENDED-SPECTRUM* (GES) PADA ISOLAT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DI RSUP dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO” dengan baik sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar pendidikan sebagai Magister Ilmu Biomedik di Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Peneliti menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan terima kasih yang tulus atas bimbingan serta kesabaran dari dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D, Sp.MK selaku Pembimbing Utama dan dr. Firdaus Hamid, Ph.D selaku Pembimbing Pendamping. Terima kasih pula kepada Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes; Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS dan Dr. Rosana Agus, M.Si selaku penguji, yang telah memberikan ilmunya dengan ikhlas sehingga tesis ini dapat peneliti selasaikan dengan baik.

Pada kesempatan ini peneliti ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setulus-tulusnya kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubulu MA, Direktur Sekolah Pasca Sarja Prof. Dr. Jamaluddin Jompa, dan Ketua Program Studi S2 Ilmu Biomedik Dr. dr. Ika Yustisia, M Sc, atas segala kebaikan dan ketulusan dalam mendampingi jalannya penelitian ini.

2. Direktur RS Pendidikan Universitas Hasanudin dan Direktur RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar atas kesempatan kepada peneliti untuk melangsungkan proses penelitian di Rumah Sakit ini.
3. Koordinator Unit Penelitian FK-UNHAS (HUM-RC) beserta staf yang telah memberi izin dan mendampingi proses pemeriksaan sampel peneliti.
4. Teman-teman seperjuangan di S2 Ilmu Biomedik, Ade Rifka Junita, Dewi Mutisari, Fatmawati Annisa, Andi zsazsa, dan Sri Wahyuni yang telah memberikan motivasi kepada peneliti untuk terus berusaha dalam menyelesaikan tesis ini.
5. Kepada semua pihak yang tidak dapat peneliti sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan moril maupun materil secara langsung maupun tidak langsung, peneliti mengucapkan terima kasih.

Penulis secara khusus menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tua ayahanda H. Ilham Dano Toka, SH dan ibunda Hj. Andi Hasnawati. yang dengan ketulusan dan penuh kasih sayang mereka dalam memberikan dukungan dan doa yang senantiasa mengiringi langkah peneliti selama menempuh pendidikan ini.

Terima kasih khususnya kepada suami, Andi Mahsyar, ST atas pengertian, pengorbanan, dukungan, semangat, serta doa yang tulus selama ini yang telah mengiringi perjalanan peneliti dalam menempuh pendidikan. Untuk anak-anak tersayang Andi Khalilah Nidaulkarimah dan

Andi Khalil Abdulkarim, terima kasih selalu menjadi sumber penyemangat peneliti selama menempuh pendidikan.

Melalui kesempatan ini pula peneliti menghaturkan permohonan maaf yang sedalam-dalamnya atas kesalahan dan kekhilafan yang telah dilakukan baik sengaja maupun tidak sengaja, selama masa pendidikan hingga selesainya tesis ini.

Akhirnya, peneliti berharap tesis ini dapat memberi manfaat bagi kita semua dan dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan Ilmu Kedokteran di masa yang akan datang. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada semua.

Makassar, 10 Januari 2022

WAHYUNITA

ABSTRAK

WAHYUNITA. Deteksi Gen Resistensi *Guiana Extended-Spectrum* (GES) pada Isolat *Pseudomonas Aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo (dibimbing oleh **Rizalinda Sjahril** dan **Firdaus Hamid**)

P. aeruginosa adalah basil gram negatif, aerobik, non-fermenter, motil yang ditemukan di banyak lingkungan dan dikenal sebagai patogen oportunistik pada manusia. Saat ini, petugas kesehatan dihadapkan dengan peningkatan jumlah infeksi *P. aeruginosa* yang resisten terhadap hampir semua antibiotik β -laktam, aminoglikosida, dan kuinolon. *blaGES* merupakan salah satu gen ESBL yang ditemukan pada *P. aeruginosa* dan terus meningkat di beberapa negara.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya gen *blaGES* pada isolat klinis *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini dapat membantu klinisi dalam menentukan terapi pasien infeksi dan digunakan sebagai acuan studi epidemiologi untuk mengontrol dan menurunkan angka kejadian resistensi antibiotik oleh *P. aeruginosa*.

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional*. Sampel penelitian adalah 85 koleksi sampel isolat klinis *P. aeruginosa* yang diambil dari bank kuman (arsip sampel) di Laboratorium RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dari Januari hingga September 2019. Sensitivitas antibiotik dideteksi dengan Vitek-2-Compact.

Hasil penelitian menunjukkan sensitivitas *P. aeruginosa* tertinggi terlihat pada antibiotik amikasin (96,5%) dan gentamisin (91,8%), diikuti oleh meropenem. Tingkat sensitivitas terendah terlihat pada antibiotik sefotaksim (1,2%). Dari 85 isolat, gen *blaGES* menunjukkan hasil amplifikasi positif pada 3 isolat (3,5%). Hasil uji genotip yang positif pada beberapa isolat dalam penelitian ini menunjukkan bahwa gen resistensi ESBL minor sudah ditemukan di Makassar, Sulawesi Selatan.

Kesimpulannya, hasil uji genotip yang positif pada beberapa isolat dalam penelitian ini menunjukkan bahwa gen resistensi ESBL minor sudah ditemukan di Makassar, Sulawesi Selatan, sehingga dibutuhkan penelitian secara komprehensif untuk mengetahui perkembangan prevalensi gen *blaGES* demi mencegah penyebaran infeksi oleh *P. aeruginosa*.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, *Extended Spectrum β -Lactamases* (ESBL), *blaGES*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).



ABSTRACT

WAHYUNITA. *Detection of Guiana Extended-Spectrum (GES) Resistance Gene from Pseudomonas Aeruginosa Isolates at Dr. Wahidin Sudirohusodo Hospital (supervised by Rizalinda Sjahril and Firdaus Hamid).*

P. aeruginosa is a gram-negative, aerobic, non-fermenter, motile bacillus found in many environments and is also known as an opportunistic pathogen in humans. Currently, clinicians face an increased number of *P. aeruginosa* infections resistant to almost all β -lactam antibiotics, aminoglycosides, and quinolones. The *bla*GES is one of the ESBL gene types found in *P. aeruginosa*, and it is increasing in several countries.

This study aims to detect the presence of the *bla*GES gene in *P. aeruginosa* isolates from patients at Dr. Wahidin Sudirohusodo hospital using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. This study can help clinicians determine therapy for infected patients and can be used as a reference for epidemiological studies to control and reduce the incidence of antibiotic resistance by *P. aeruginosa*.

This study is a cross-sectional study. The research sample consisted of 85 clinical isolates of *P. aeruginosa* taken from the germ bank (sample archive) in the Laboratory of Dr. RSUP. Wahidin Sudirohusodo from January to September 2019. An antibiotic sensitivity test detects with the Vitek-2-Compact system.

The result showed that the sensitivity of *P. aeruginosa* was high with antibiotic amikacin (96.5%) and gentamicin (91.8%), followed by meropenem (78.8%). For the lowest level of sensitivity seen in cefotaxime (1.2%). From 85 isolates, the *bla*GES gene showed positive amplification results in 3 isolates (3.5%). The positive genotypic test results on several isolates in this study indicated that minor ESBL resistance genes had been found in Makassar, South Sulawesi.

In conclusion, the positive genotypic test results on several isolates in this study indicate that minor ESBL resistance genes have been found in Makassar, South Sulawesi, so a further comprehensive study is needed to determine the development of the *bla*GES gene prevalence to prevent the spread of infection by *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL)*, *bla*GES, *Polymerase chain reaction (PCR)*.

 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris,
Tanggal : <u>30/11/2021</u>	

DAFTAR ISI

PENGESAHAN TESIS	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Hipotesis	5
E. Manfaat penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
B. Antibiotik	
1. Definisi	9
2. Klasifikasi Antibiotik β -Lactam	10
3. Mekanisme Kerja Antibiotik	11

C. <i>Extended Spectrum β-Lactamases (ESBL)</i>	
1. Definisi	12
2. Klasifikasi ESBL	13
3. Mekanisme Resistensi	16
4. Tipe Gen ESBL	20
D. Pemeriksaan Resistensi Bakteri	
1. Uji Konvensional	23
2. Uji Otomatis	25
E. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	27
BAB III KERANGKA PENELITIAN	
A. Kerangka Teori	31
B. Kerangka Konsep	32
C. Definisi Operasional	32
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
A. Rancangan Penelitian	34
B. Waktu dan Tempat Penelitian	34
C. Populasi dan Sampel Penelitian	
1. Populasi Penelitian	34
2. Sampel Penelitian	34
D. Kriteria Sampel Penelitian	
1. Kriteria Inklusi	35
2. Kriteria Eksklusi	35

E. Alat dan Bahan Penelitian	
1. Alat	35
2. Bahan	35
F. Cara Kerja	
1. Pengumpulan dan Persiapan Sampel	36
2. Ekstraksi DNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
3. Pemeriksaan PCR	38
4. Elektroforesis Gel Agarosa	38
G. Skema Alur Penelitian	40
H. Analisis Statistik	40
I. Etik Penelitian	41
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian	
1. Karakteristik Variabel Penelitian	42
2. Karakteristik gen GES pada isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap tes sensitivitas antibiotik	47
3. Hubungan gen GES pada isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dengan tes sensitivitas antibiotik dan lama perawatan pasien	50
4. Hasil Elektroforesis produk PCR gen GES pada isolat klinis <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
B. Pembahasan	51

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	61
B. Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi β -Lactamase	15
Tabel 2. Kelompok Mayor dan Minor β -Lactamase	15
Tabel 3. ESBL Tipe Minor	21
Tabel 4. Tipe Gen GES	22
Tabel 5. Interpretasi Tes Skrining dengan Metode <i>Disk Diffusion</i> dan MIC <i>Determination</i>	25
Tabel 6. Prevalensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> berdasarkan jenis kelamin, kelompok umur, dan asal spesimen	43
Tabel 7. Prevalensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> berdasarkan diagnosis dan lama perawatan pasien	44
Tabel 8. Prevalensi temuan gen GES pada isolat klinis <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	45
Tabel 9. Profil sensitivitas antibiotik pada isolat klinis <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	45
Tabel 10. Profil sensitivitas antibiotik pada isolat klinis <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> pada spesimen pus (n=33)	46
Tabel 11. Profil sensitivitas antibiotik pada isolat klinis <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> pada spesimen sputum (n=30)	47
Tabel 12. Karakteristik gen GES pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap tes sensitivitas antibiotik	48
Tabel 13. Karakteristik temuan gen GES terhadap prevalensi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme kerja Antibiotik terhadap Antimikroba	12
Gambar 2. Mekanisme Resistensi secara Genetik	17
Gambar 3. Mekanisme Resistensi secara Biokimia	20
Gambar 4. Prinsip kerja <i>Polymerase Chain Reaction</i>	30
Gambar 5. Kerangka Teori	31
Gambar 6. Kerangka Konsep	32
Gambar 7. Alur Penelitian	40
Gambar 8. Hasil Elektroforesis produk multiplex PCR untuk gen GES dengan marker 100bp	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekomendasi Persetujuan Etik	67
Lampiran 2. Hasil tes sensitivitas antibiotik pada isolat bakteri	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Lampiran 3. Hasil Elektroforesis amplifikasi negatif pada isolat	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71

DAFTAR SINGKATAN

β	Beta
AES	Advanced Expert System
BEL	Belgium Extended Spectrum β -Lactamase
BES	Brazilian Extended Spectrum β -Lactamase
BSC	Biological Safety Cabinet
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX-M	Cefotaxim Munich
DNA	Deoksiribonukleat Acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphates
EDTA	Ethyenediaminetetraacetic Acid
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
GES	Guiana Extended Spectrum
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
MDR	Multidrug Resistant
MgCl ₂	Magnesium clorida
MIC	Minimum Inhibitori Concentration
OMP	Outer Membrane Proteins
OXA	Active on Oxacilin
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PER	Pseudomonas Extended Resistance
SFO	Serratia Fonticola

SHV	Sulfhydryl variable
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEM	Temoniera
TLA	Tlahuicas
TSIA	Triple Sugar Iron Agar
UV	Ultraviolet
VEB	Vietnam Extended Spectrum β -Lactamase

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Resistensi antibiotik merupakan kemampuan mikroorganisme untuk bertahan terhadap efek antibiotik, yang awalnya masih bersifat sensitif terhadap efek antibiotik kemudian tidak efektif lagi terhadap terapi. Infeksi patogen yang resisten terhadap antibiotik membutuhkan perawatan yang lebih lama, lebih kompleks, dan membutuhkan banyak biaya sehingga meningkatkan morbiditas dan mortalitas serta berdampak pada perekonomian. Karena beberapa faktor tersebut, maka resistensi antibiotik saat ini menjadi masalah kesehatan yang global di dunia, baik di negara maju maupun berkembang (Bavasheh & Karmostaji, 2017; Shankar & Balasubramanium, 2014).

Prevalensi infeksi nosokomial yang disebabkan oleh bakteri gram negatif lebih tinggi daripada gram positif. Peningkatan angka resistensi pada bakteri gram negatif, sebagian besar diperantarai oleh plasmid (*mobile genetic elements*), sehingga penyebarannya sangat cepat terjadi pada populasi bakteri (Pobiega et al, 2014).

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri basil gram negatif, aerobik, oksidasi-positif, *non-fermenter*, motil, yang mendiami berbagai macam lingkungan, seperti air, tanah, rhizosfer, dan hewan. Dikenal juga sebagai patogen oportunistik pada hewan dan manusia. Beberapa laporan menunjukkan bahwa bakteri ini juga menyebabkan infeksi pada inang

yang sehat (Azimi et al, 2016). Bakteri ini memiliki kebutuhan nutrisi yang minimal, mentolerir berbagai macam kondisi fisik dan membentuk *biofilm* pada permukaan biotik atau abiotik (Ahmed & Asghar, 2017).

Di rumah sakit, *P. aeruginosa* adalah penyebab utama infeksi nosokomial melalui kolonisasi kateter, luka kulit, dan pneumonia akibat penggunaan ventilator. Karena resistensi antibiotik yang tinggi dan kemampuan untuk mengembangkan resistensi baru selama pengobatan antibiotik, infeksi karena *P. aeruginosa* sulit diberantas dan dapat menjadi persisten atau bahkan kronis, karena pengobatan fisik menjadi sulit dan tidak efektif (Ahmed & Asghar, 2017; Bavasheh & Karmostaji, 2017).

Saat ini para klinisi dihadapkan pada semakin meningkatnya infeksi *P. aeruginosa* yang resisten terhadap semua atau hampir semua antibiotik β -lactam, aminoglikosida dan quinolon (Pobiega et al, 2014). Beberapa mekanisme yang mempengaruhi resistensi β -lactam pada *P. aeruginosa* adalah penghancuran enzim β -lactamase pada antibiotik, perubahan target pada antibiotik, penurunan uptake intraseluler antibiotik. (Lin et al, 2012).

Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL) adalah sekelompok enzim β -lactamase yang menghidrolisis *penicillin* dan *cephalosporin*, termasuk *oxymino- β -lactam* (generasi ketiga dan keempat dari *cephalosporin*) dan *aztreonam*, dan dihambat oleh penghambat β -lactamase, seperti *clavulanat acid*, *sulbactam* dan *tazobactam*. Salah satu mekanisme resisten antibiotik adalah diproduksinya enzim β -laktamase.

Pseudomonas aeruginosa adalah salah satu bakteri gram negatif *non-fermenter* yang menghasilkan enzim β -lactamase (Laudy et al, 2017).

Jenis ESBL yang ditemukan pada *P. aeruginosa* adalah SHV, TEM, CTX-M, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA dan GES (Olowe & Adefioye, 2014). Salah satu jenis yang mulai bermunculan diantaranya *Guiana extended-spectrum* (GES). GES-1 β -lactamase pertama kali terdeteksi pada isolat *Klebsiella pneumoniae* dari pasien neonatal yang baru saja dipindahkan ke Prancis dari Guyana pada tahun 1998 dan kemudian terdeteksi pada *P. aeruginosa* dari bagian geografis yang berbeda (Poirel et al, 2000). Gen GES-1 memiliki aktivitas hidrolitik terhadap *penicillin* dan *cephalosporin* spektrum luas, tetapi tidak terhadap *cephamicin* atau *carbapenem*, dan dihambat oleh inhibitor β -laktamase. (Shaikh et al, 2015). Secara umum, GES memiliki variasi yang berbeda, ada yang menyandi ESBL dan yang lainnya menyandi *carbapenemase*. Namun, sifat enzimatik GES-1 mirip dengan ESBL kelas A lainnya. Dengan demikian, GES-1 diakui sebagai anggota ESBL. (Ahmed & Asghar, 2017).

Deteksi genotip ESBL dengan teknik PCR merupakan teknik molekuler yang saat ini berkembang pesat dan tidak meragukan memiliki peranan penting dalam pemeriksaan laboratorium, baik untuk kepentingan skrining, melacak maupun memonitor penyebaran ESBL di rumah sakit (Shaikh et al, 2015). Karakteristik genotip ESBL dapat membantu mengetahui substrat yang dihidrolisis oleh antibiotik. Dengan mengetahui jenis gen penyandi ESBL dari agen infeksi nosokomial, khususnya *P.*

aeruginosa, maka dapat diarahkan pada pemilihan pengobatan yang tepat, serta pencegahan dan pengendalian munculnya resistensi antibiotik di lingkungan rumah sakit (Bavasheh & Karmostaji, 2017).

Karakteristik genetik ESBL kelas A yang terdapat pada isolat klinis bakteri di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo pernah diteliti sebelumnya, yaitu gen TEM, CTX-M, dan SHV. Pengetahuan tentang banyak karakteristik genetik ESBL akan sangat memudahkan dalam penatalaksanaan penyakit. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan pertama kali untuk mendeteksi gen GES pada strain *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi secara klinis dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar sejak Januari sampai September 2019 menggunakan metode PCR (*Polymerase chain reaction*).

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ditemukan gen GES pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?
2. Bagaimana karakteristik gen GES terhadap tes sensitivitas antibiotik yang terdapat pada *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?
3. Apakah ada hubungan antara keberadaan gen GES dengan hasil tes sensitivitas antibiotik pada *Pseudomonas aeruginosa* dan lama perawatan pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui adanya gen GES pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

2. Tujuan Khusus

A. Untuk mengetahui keberadaan gen GES pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

B. Untuk mengetahui karakteristik gen GES pada *Pseudomonas aeruginosa* terhadap tes sensitivitas antibiotik dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

C. Untuk mengetahui hubungan antara keberadaan gen GES dengan hasil tes sensitivitas antibiotik pada *Pseudomonas aeruginosa* dan lama perawatan pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

D. Hipotesis

Ditemukan gen resistensi penyandi ESBL GES pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode *Polymerase chain reaction* (PCR) dan hasil tes sensitivitas antibiotik pola sensitivitas terhadap antibiotik sesuai dengan hasil PCR gen GES pada *Pseudomonas aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat bagi peneliti: penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai keberadaan GES pada isolat *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Manfaat bagi keilmuan:
 - a. Pemeriksaan genetik melalui PCR dapat digunakan mendeteksi ada tidaknya gen resistensi tertentu pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sehingga dapat membantu klinisi dalam terapi pasien infeksi.
 - b. Memberikan informasi genetik pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, dan Makassar pada umumnya.
 - c. Data penelitian dapat digunakan sebagai acuan studi epidemiologi untuk mengontrol dan menurunkan angka kejadian resistensi antibiotik oleh *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Manfaat bagi masyarakat: penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu acuan dalam pemberian terapi dan pencegahan penyakit sehingga menurunkan mortalitas dan morbiditas penyakit.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif aerob yang bersifat *non-fermenter*, dapat hidup di berbagai lingkungan seperti tanah, bahan organik, air, tumbuhan, hewan, permukaan yang lembab, termasuk lingkungan rumah sakit dan peralatan kesehatan. *P. aeruginosa* merupakan patogen utama pada infeksi yang didapatkan di rumah sakit. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi gastrointestinal, sepsis, osteomielitis, peritonitis, infeksi jaringan lunak, infeksi kulit termasuk infeksi pada luka dan luka bakar (Bavasheh & Karmostaji, 2017; Wu et al, 2011).

Bakteri ini secara alamiah memiliki resistensi terhadap beberapa antibiotik, akibatnya infeksi yang disebabkan bakteri ini sulit untuk diatasi dan dapat mengancam jiwa, khususnya jika disebabkan oleh strain yang multiresisten. Meningkatnya prevalensi infeksi *P. aeruginosa multidrug-resistant* (MDR), termasuk resisten terhadap β -lactam spektrum luas, *aminoglikosida* dan *fluoroquinolon*, semakin menyulitkan pemilihan terapi antibiotik yang tepat. Infeksi yang disebabkan oleh *P. Aeruginosa* berkaitan dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi di seluruh dunia. Infeksi nosokomial *P. aeruginosa* telah dilaporkan terdapat luka bedah, menyebabkan infeksi luka pasca operasi. Selain itu, *P. aeruginosa*

dapat menyebar dari tempat infeksi awal dan masuk ke aliran darah, menyebabkan septikemia. (Streeter & Katouli, 2016)

Faktor virulensi dari *P. aeruginosa* terletak pada pili, lipopolisakarida, sideropora, eksotoksin A, eksoenzim S, U, T, Y, elastase, *protease*, *posfolipase* dan alginat. Enzim elastase dan protease yang dihasilkan oleh *P. Aeruginosa* mengakibatkan proteolisis dan mengakibatkan rusaknya jaringan host. Pada enzim *posfolipase*, kerusakan jaringan *host* dapat terjadi dikarenakan fosfolipid *host* yang terhidrolisis (Mittal, Aggarwal, Sharma, Chhibber, & Harjai, 2009)

P. aeruginosa memproduksi pigmen piosianin dan pioverdine yang dapat dikenali dari warna hijau-biru pada media agar setelah dikultur. Bakteri ini dapat tumbuh pada temperatur 20°C–43°C, bersifat resisten terhadap antibiotik *penicillin* dan *cephalosporins* generasi pertama dan kedua, *tetracycline*, *chloramphenicol*, dan *vancomycin*. Antibiotik yang efektif dalam menekan infeksi akibat bakteri ini adalah *carbapenem*, *piperacillin*, *cefepime*, *ceftazidime*, *ciprofloxacin*, *amikacin* dan *tobramycin* (Bavasheh & Karmostaji, 2017).

P. aeruginosa dapat dijumpai di tempat lembab, ditemukan pada peralatan rumah sakit, alat bantu pernafasan, *shower* dan pipa-pipa saluran. Pada negara beriklim tropis, musim hujan menjadi waktu dimana bakteri ini tumbuh tak terkendali. *P. aeruginosa* dapat ditemukan sebagai flora normal pada orang sehat dan berkolonisasi pada saluran pencernaan dan bagian-bagian tubuh yang lembab seperti

tenggorokan, mukosa hidung, kulit ketiak dan perineum. (Bavasheh & Karmostaji, 2017).

Pengambilan spesimen bakteri *P. Aeruginosa* diperoleh dari lesi kulit, urin, darah, pus, cairan spinal, dan sputum tergantung jenis infeksi yang diderita. Medium yang dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri adalah medium *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) (Brooks et al, 2004).

Medium lain yang dapat digunakan untuk kultur bakteri *P. Aeruginosa* adalah *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Medium ini membedakan bakteri berdasarkan pola fermentasi karbohidrat, diantaranya glukosa, laktosa, dan sukrosa. Pada *P. Aeruginosa*, TSIA tampak berwarna merah karena adanya degradasi glukosa dan dijadikannya pepton sebagai sumber nutrisi untuk bakteri. Perptom kemudian menghasilkan amonia sehingga pH menjadi basa (Brooks et al, 2004).

B. Antibiotik

1. Definisi

Antibiotik adalah substansi kimia yang dihasilkan dari berbagai macam spesies mikroorganisme atau diproduksi secara semisintesis dan sintesis untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme. Antibiotik adalah agen antimikroba yang paling umum digunakan dalam pengelolaan infeksi bakteri secara global. Mereka telah digunakan selama lebih dari 50 tahun untuk meningkatkan kesehatan manusia. Antibiotik berdasarkan

strukturnya terdiri dari dua golongan yaitu *β-lactam* dan *non β-lactam*. Golongan *β-lactam* adalah golongan antibiotik yang sering digunakan (Bbosa et al, 2014; Murray et al, 2016).

2. Klasifikasi Antibiotik *β-Lactam*

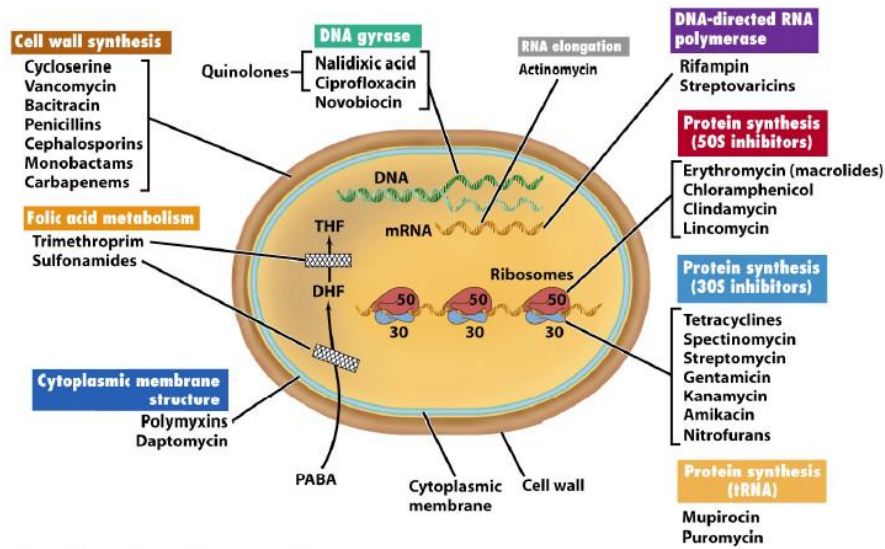
Antibiotik *β-lactam* terdiri dari berbagai golongan obat yang mempunyai struktur cincin *β-lactam* yaitu memiliki struktur kimia yang tersusun tiga karbon dan satu struktur *nitrogen-cyclic amine*, sisi rantai lain berhubungan dengan cincin *β-lactam* menggambarkan variasi grup antibiotik dan melekat pada struktur inti melalui ikatan peptida. Perbedaan sisi rantai ini berperan terhadap aktivitas antibiotik. Antibiotik golongan *β-lactam* terdiri dari empat kelas yaitu *penicillin*, *cephalosporin*, *carbapenem*, dan *monobactam* (Brooks et al, 2004).

Komponen cincin *β-lactam* bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara mengikat enzim *β-lactamase*. Cincin *β-lactam* yang terikat pada *penicillin binding protein* (PBP) akan menghentikan proses sintesis dinding sel. Proses sintesis dinding sel yang terhenti akan menyebabkan kematian sel. Hal ini terjadi karena ketidakseimbangan osmotik yang disebabkan dari kegagalan sintesis (Murray et al, 2016).

3. Mekanisme Kerja Antibiotik

Lima mekanisme kerja antibiotik terhadap mikroorganisme antara lain (Brooks et al., 2004; Murray et al., 2016) :

- a. Inhibisi sintesis dinding sel. Antibiotik β -lactam seperti *penicillin* dan *cephalosporin* bekerja dengan cara berikatan dengan reseptor *penicillin-binding protein* (PBP) yang merupakan enzim yang dibutuhkan untuk sintesis *peptidoglycan* (*glycosyltransferases*, *transpeptidases* dan *carboxypeptidases*). Ikatan antibiotik β -lactam dengan PBP menghambat sintesis *peptidoglycan* yang membentuk dinding sel bakteri sehingga menghentikan pertumbuhan bakteri.
- b. Inhibisi fungsi membran sel. Ikatan antibiotik golongan lipopeptida *daptomycin* dan *polymixin* dengan membran sitoplasma sel bakteri menyebabkan disintegritas fungsional membran sitoplasma menyebabkan terganggunya *efflux* ion dan makromolekul dari sel, sehingga terjadi kerusakan dan kematian sel.
- c. Inhibisi sintesis protein, seperti aminoglikosid yang menghambat inisiasi protein sintesis dan ikatan terhadap subunit ribosom 30s.
- d. Menghambat sintesis atau fungsi asam nukleat, seperti pada *quinolon* menghambat sintesis DNA dengan mengganggu *topoisomerase*, *DNA gyrase* dan *topoisomerase* tipe IV selama siklus replikasi dan menyebabkan pecahnya *double strand*.
- e. Inhibisi jalur metabolisme. Sulfonamide dan trimetoprim memblokir kunci utama proses sintesis folat, yaitu kofaktor biosintesa nukleotida.



Gambar 1. Mekanisme kerja antibiotik terhadap antimikroba

(Bbosa et al, 2014)

C. *Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL)*

1. Definisi

β -lactamase adalah enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan 4-cincin *β -lactam* dari antibiotik golongan *β -lactam*. ESBL berasal dari enzim *β -lactamase* yang termutasi, mutasi ini menyebabkan peningkatan aktivitas enzimatik *β -lactamase* sehingga mampu menghidrolisis antibiotik golongan *β -lactam* meliputi *oxyimino* seperti *oxyimino-cephalosporins* (meliputi *ceftazidime*, *cefotaxime*, dan *ceftriaxone*) dan *oxyimino-monobactam* (seperti *aztreonam*), kecuali *cephamycins* (meliputi *cefoxitin* and *cefotetan*) dan *carbapenems* (meliputi *meropenem* atau *imipenem*) (Paterson & Bonomo, 2005; Yadav et al, 2015).

Penggunaan antibiotika golongan *cephalosporin* generasi ke-3 secara luas untuk pengobatan infeksi di rumah sakit merupakan salah satu faktor risiko infeksi oleh bakteri penghasil *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL). Selain *cephalosporin*, bakteri penghasil ESBL juga sering menunjukkan resistensi pada penggunaan antibiotik golongan *quinolon*. Penggunaan antibiotika yang berlebihan, pasien dengan penyakit berat, perawatan yang lama di rumah sakit dan dirawat dengan alat-alat medis yang sifatnya invasif untuk waktu yang lama juga merupakan risiko tinggi untuk terinfeksi oleh bakteri penghasil ESBL (Yadav et al, 2015).

2. Klasifikasi ESBL

β -lactamase umumnya diklasifikasikan menurut dua skema umum : klasifikasi molekul Ambler dan klasifikasi fungsional Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995). Metode original kategorisasi β -laktamase adalah klasifikasi Ambler yang membagi enzim menjadi 4 kelas (A, B, C, dan D) berdasarkan struktur molekul. β -lactamase secara fungsional (*Bush-Jacoby-Medieros functional*) dibagi berdasarkan kesamaan fungsi substrat dan profil inhibitor. Klasifikasi ini lebih relevan karena berdasarkan β -lactamase inhibitor dan β -lactamase substrate. Klasifikasi ini membagi β -lactamase menjadi 4 grup dan beberapa subgrup. β -lactamase secara molekular berdasarkan pada urutan asam amino dan nukleotidanya. Klasifikasi ini dibagi menjadi A, B,

C dan D. Kelas A, C, dan D merupakan *serine-based mechanism* sedangkan kelas B atau *metallo β -lactamase* membutuhkan ion zink. Ada berbagai genotipe ESBL, yang paling umum adalah jenis SHV, TEM, dan CTX-M. Jenis klinis penting lainnya termasuk VEB, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA, dan IBC (Bush & Jacoby, 2010; Rupp & Fey, 2003)

Pada tahun 1995, Bush *et al.*, merancang klasifikasi *β -lactamase* berdasarkan karakteristik fungsional dan profil substratnya, klasifikasi yang banyak digunakan. Enzim dibagi menjadi tiga kelompok utama: kelompok 1 *Cephalosporinase* yang tidak dihambat oleh clavulanat acid, kelompok 2 umumnya dihambat oleh clavulanat acid (kecuali kelompok 2d dan 2f) dan kelompok 3 *metallo β -lactamase*. Sebagian besar ESBL diberikan ke kelompok 2be, yaitu menghidrolisis *penicillin*, *cephalosporin*, dan *monobactam*, dan dihambat oleh *clavulanat acid* (Dhillon & Clark, 2012).

Tabel 1 menggambarkan versi klasifikasi fungsional yang diusulkan awalnya oleh Bush pada tahun 1989 dan dikembangkan pada tahun 1995. Tabel ini menyelaraskan klasifikasi struktural dan fungsional sedekat mungkin. Sub kelompok fungsional baru telah ditambahkan ke skema sebagai hasil dari identifikasi dan pengembangan kelompok mayor *β -lactamase* di mana varian terus diidentifikasi secara teratur digambarkan pada tabel 2. Seperti pada klasifikasi fungsional sebelumnya, enzim diselaraskan berdasarkan kemampuannya untuk menghidrolisis antibiotik

kelas β -lactam spesifik berupa *clavulanat acid*, *sulbactam*, dan *tazobactam* (Bush & Jacoby, 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medicinos group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftioxaone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftioxaone	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfb-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

Tabel 1. Klasifikasi β -lactamase. (Bush & Jacoby, 2010)

Enzyme family ^a	Functional group or subgroup	No. of enzymes ^{b,c}	Representative enzymes
CMY	1, 1e	50	CMY-1 to CMY-50
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2b	12	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2be	79	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2br	36	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
	2ber	9	
SHV	2b, 2be, 2br	127	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2b	30	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2be	37	SHV-10, SHV-72
	2br	5	
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) to CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 to PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 to VEB-7
GES	2f	15 ^d	GES-2 to GES-7 (IBC-1) to GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 to KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d, 2de, 2df	158	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2d	5	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2de	9	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
	2df	48 ^e	
IMP	3a	26	IMP-1 to IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 to VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 to IND-7

^a Enzyme families include those for which numbers have been assigned based on primary amino acid structures (G. Jacoby and K. Bush, <http://www.lahcy.org/Studies/>).

^b Compiled through December 2009.

^c The sum of the subgroups in each family does not always equal the total number of enzymes in each family, because some enzyme numbers have been withdrawn, and some enzymes have not been assigned a functional designation by the investigators who provided the amino acid sequence.

^d GES-1, unlike other members of the GES family, has little detectable interaction with imipenem (49).

^e Nine clusters of OXA carbapenemases with their individual members have been designated in Table 6 in reference 52.

Tabel 2. Kelompok mayor dan minor β -lactamase (Bush & Jacoby, 2010)

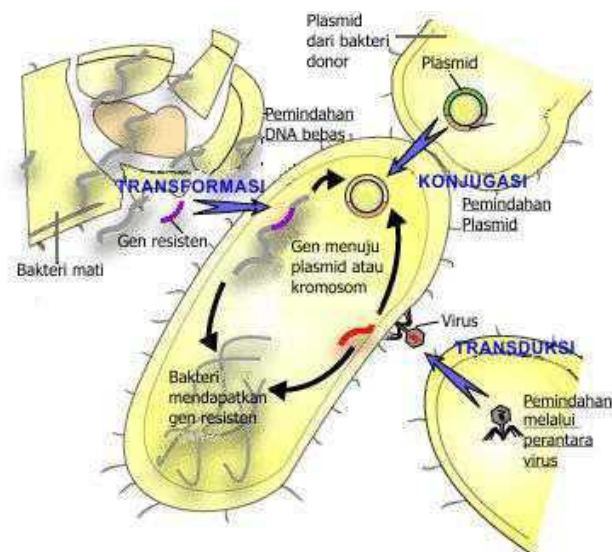
Struktur dan mekanisme kerja enzim β -lactamase yaitu semua ESBL memiliki *serine* yang terletak di *active sites* kecuali sebagian kecil class B Grup *metallo β -lactamase* dan memiliki banyak kesamaan asam amino dengan *penicillin binding proteins* (PBP). β -lactamase akan menyerang ikatan amida di cincin β -lactam *penicillin*, *cephalosporin* serta menghasilkan *penicillinoic acid* dan *cephalosporic acid* sehingga senyawa anti bakteri menjadi tidak aktif. Pada organisme penghasil ESBL juga sering resisten terhadap antibiotik *aminoglikosida*, *fluoroquinolone*, *tetracyclin*, *chloramphenicol* dan *sulfametoxzol-trimethoprim* (Tham, 2012).

Pada ESBL terjadi substitusi asam amino dan mengakibatkan perubahan konfigurasi enzim. Perubahan ini akan merubah fungsi enzim tersebut. Terbukanya substrat β -lactam biasanya juga dapat meningkatkan kemampuan enzim β -lactamase, contohnya substitusi asam amino tunggal pada posisi 104, 164, 238, dan 240 menghasilkan ESBL. Biasanya ESBL dengan spektrum luas memiliki lebih dari satu substitusi asam amino (Tham, 2012).

3. Mekanisme Resistensi

Resistensi antibiotik adalah kondisi dimana mikroorganisme mampu bertahan terhadap paparan antibiotik. Mekanisme resistensi antibiotik dapat terjadi dapat melalui genetika dan biokimia. Mutasi genetik pada

bakteri baik spontan maupun diinduksi dapat menyebabkan resisten terhadap agen antibiotik, gen resisten dapat ditransfer antar bakteri dengan cara konjugasi (plasmid dipindah dari satu bakteri ke bakteri lain melalui jembatan yang dibentuk pada perlekatan antara bakteri donor dan bakteri penerima), cara transduksi (gen resisten dibawa oleh bakteriofag yang melekat ke dinding bakteri penerima dan memasukkan DNA yang dibawanya) atau dengan cara transformasi (kromosom DNA yang tanpa pelapis dilepaskan dari bakteri yang lisis dan masuk ke bakteri penerima). Selain itu, terdapat mekanisme secara transmisi dimana gen resisten berkembang melalui seleksi alam atau tekanan seperti paparan antibiotik, penyebaran, atau perubahan materi genetik oleh plasmid. Jika bakteri membawa beberapa gen resisten maka disebut *multidrug-resistant* (MDR) (Barie, 2012; Davies & Davies, 2010).



Gambar 2. Mekanisme resistensi secara genetik (Todaro, 2011)

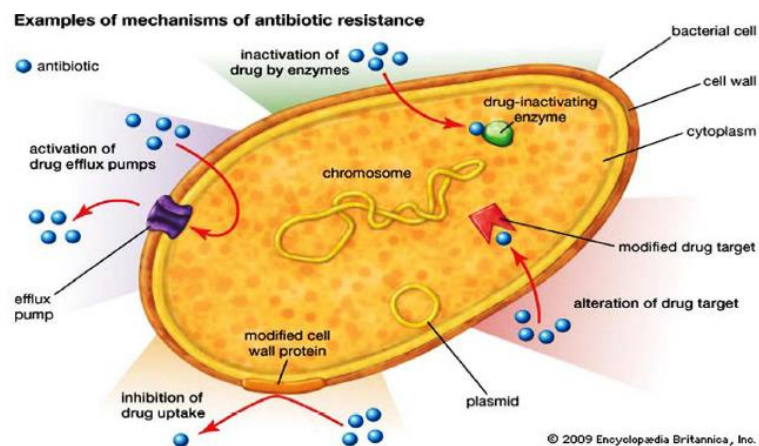
Mekanisme terjadinya resistensi oleh bakteri terhadap antibiotik β -*lactam* secara biokimia terjadi melalui empat cara yaitu : (Bbosa et al., 2014)

- a. Perubahan *penicillin binding protein* (PBP) menyebabkan lemahnya afinitas cincin β -*lactam* terhadap PBP. PBP adalah karboksipeptidase yang dicirikan oleh afinitasnya untuk mengikat *penicillin*. Semua antibiotik β -*lactam* mengikat PBP untuk memblokir perakitan akhir *peptidoglycan*, mencegah bakteri membangun dinding sel. Ada sejumlah besar PBP, biasanya beberapa di setiap organisme, dan mereka ditemukan sebagai protein yang terikat membran dan sitoplasma. PBP yang berbeda terjadi dalam jumlah yang berbeda per sel dan memiliki afinitas yang bervariasi terhadap *penicillin*. Semua PBP terlibat dalam sintesis *peptidoglycan*, yang merupakan komponen utama dinding sel bakteri. Resistensi terhadap antibiotik terjadi melalui produksi PBP yang berlebihan dan generasi PBP yang memiliki afinitas pengikatan yang rendah untuk *penicillin*.
- b. Memiliki dinding sel yang tidak dapat dilalui oleh molekul antibiotik untuk penetrasi ke dalam sel bakteri yang disebabkan penurunan ekspresi *outer membrane proteins* (OMP). Porin adalah protein berbentuk barel yang memanjang ke dalam membran sel dan bertindak sebagai pori tempat molekul dapat berdifusi. Porin hadir di dinding sel bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Agar antibiotik efektif melawan bakteri, ia harus melewati membran luar,

menggunakan porin untuk memungkinkan difusi. Bakteri dapat mengembangkan resistensi terhadap antibiotik dengan memutasi gen yang mengkode porin, yang mengubah konformasi protein porin dan melarang antibiotik melewati membran luar antibiotik hidrofilik tertentu, seperti *β-lactam*, *aminoglikosida*, *tetracyclin*, dan beberapa *fluoroquinolon*, melintasi membran luar melalui saluran porin. Hilangnya saluran porin tertentu (di mana *P. aeruginosa* memiliki setidaknya 64) dapat meningkatkan kerentanan agen antibakteri spesifik *P. aeruginosa*.

- c. Mengaktifkan mekanisme “*efflux pumps*” terhadap antibiotik oleh sel menyebabkan bakteri mengeluarkan substrat antibiotik dari periplasma ke luar sel. Pengeluaran aktif secara mekanis bertanggung jawab untuk ekstrusi zat beracun dan antibiotik di luar sel, dan merupakan mekanisme penting yang berkontribusi terhadap resistensi antibiotik. Beberapa sistem eflux spesifik untuk obat tertentu, namun beberapa yang lainnya dapat menampung banyak obat, sehingga memberi pengaruh positif pada patogenesis MDR. Antibiotik dapat memilih mutan yang mengekspresikan gen *efflux pump* secara berlebihan. Dengan demikian, antibiotik dapat bertindak sebagai penginduksi dan pengatur ekspresi beberapa *efflux pump*. Ekspresi beberapa *efflux pump* dalam spesies bakteri tertentu dapat menyebabkan resistensi spektrum luas, sedangkan satu gen *efflux pump multidrug* dapat memberikan resistensi terhadap berbagai antimikroba.

d. Memproduksi enzim β -lactamase yang menghidrolisis cincin β -lactam dan menginaktivasi β -lactam. β -lactam digunakan untuk melawan bakteri gram positif dan gram negatif. Karena perbedaan struktur dinding sel antara gram positif dan negatif akan berbeda pula pola resistensinya. Bakteri yang memproduksi β -lactamase dan menghancurkan β -lactam merupakan penyebab utama terjadinya resistensi.



Gambar 3. Mekanisme resistensi secara biokimia (Bbosa et al., 2014)

4. Tipe Gen ESBL

ESBL berdasarkan prevalensi genetiknya dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu tipe mayor dan minor. ESBL tipe mayor umumnya diekspresikan pada isolat klinis dan dideteksi pada banyak tempat di seluruh dunia, sedangkan tipe minor secara lokasi geografi jarang atau terbatas ditemukan. Tiga tipe mayor diantaranya TEM, SHV dan CTX-M (Bush & Jacoby, 2010). Tipe lain yang penting adalah OXA, VEB dan PER. Gen ESBL lain baru-baru ini dijelaskan tidak memiliki kaitan erat

dengan turunan TEM-1- atau SHV-1. Tipe gen ESBL tersebut ditemukan dalam berbagai spesies berbeda dalam kelompok *Enterobacteriaceae* dan *P. Aeruginosa* namun jarang dilaporkan karena masih dalam jumlah yang sedikit pada daerah geografis tertentu, seperti GES, BES, SFO, TLA dan IBC (Bradford, 2001; Libischet al, 2008; Rupp & Fey, 2003).

β -Lactamase name	Year ^a	No. of variants	Origin of the name
'Old ESBL'			
SHV type	1983	>100	Sulphydryl variable
TEM type	1985	>160	Patient's name: <u>Temoneira</u>
'New ESBL'			
CTX-M type	1989	>65	Cefotaximase— <u>Munich</u>
'Minor ESBL'			
SFO-1	1988	1	<u>Serratia fonticola</u>
TLA-1	1991	1	<u>Tlahuicas (Indian tribe)</u>
PER	1991	3	<u>Pseudomonas extended resistance</u>
VEB	1996	5	<u>Vietnam extended-spectrum β-lactamase (ESBLs)</u>
BES-1	1996	1	<u>Brazilian ESBLs</u>
GES	1998	9	<u>Guyana ESBLs</u>
BEL-1	2005	1	<u>Belgium ESBLs</u>
TLA-2	2005	1	51% amino-acid identity with <u>TLA-1</u>
OXA ESBLs			
OXA	1991	At least 9	Hydrolysis of <u>oxacillin</u> > penicillin

^aYear first recorded.

Tabel 3. ESBL tipe minor (Naas, Poirel, & Nordmann, 2008)

Gen GES

ESBL dari tipe GES (*Guiana extended spectrum*) dilaporkan semakin banyak pada batang gram-negatif, termasuk *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. GES-1 awalnya dikarakterisasi dalam isolat *Klebsiella pneumoniae* dari Prancis, dikodekan oleh plasmid dan integron (Poirel et al, 2000). GES-2 berasal dari Afrika Selatan, GES-5, GES-6, GES-7 dan GES-8 berasal dari Yunani, dan GES-3 dan GES-4 berasal dari Jepang. GES-5 juga telah dilaporkan dari

Korea, Cina dan Brazil. Jadi, varian GES yang serupa sekarang telah diidentifikasi di negara yang terpisah jauh (Tabel 4) (Naas et al., 2008).

GES variant	GenBank accession numbers	Country	Strain	Ambler position ^a					Hydrolysis profile ^b				Inhibition ^c
				62	104	126	170	243	CAZ	FOX	ATM	IPM	Ac clav
GES-1	AF156486	France, Argentina, Brazil, Portugal and The Netherlands	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	+	-	-	-	S
GES-2	AF326333	South Africa	<i>P. aeruginosa</i>				Asn		+	-	-	-	P
GES-3	AB113380	Japan, China and Korea	<i>K. pneumoniae</i>	Thr	Lys				+	-	-	-	S
GES-4	AB116260	Japan	<i>K. pneumoniae</i>	Thr	Lys			Ser	+	-	-	-	P
GES-5	AY494717	Greece, Korea, China and Brazil	<i>Escherichia coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>					Ser	+	-	-	-	P
GES-6	AY494718	Greece	<i>K. pneumoniae</i>		Lys			Ser	+	-	-	-	P
GES-7 (IBC-1)	AF208529	Greece	<i>Enterobacter cloacae</i>		Lys				+	-	-	-	S
GES-8 (IBC-2)	AF329699	Greece	<i>P. aeruginosa</i>			Leu			+	-	-	-	S
GES-9	AY920928	France	<i>P. aeruginosa</i>					Ser	+	-	+	-	S

^aOnly amino-acid changes as compared to GES-1 are indicated.
^b+ and -, hydrolysis and no hydrolysis, respectively.
^cp means poorly inhibited and s means similarly inhibited as compared to GES-1.
 CAZ, Cefazidime; FOX, ceftoxitin; ATM, Aztreonam; IPM, imipenem; Ac clav.

Tabel 4. Tipe gen GES (Naas et al., 2008)

GES-1 memiliki profil hidrolisis yang mirip dengan ESBL kelas A Ambler yaitu memiliki aktivitas melawan *penicillin* dan *cephalosporin* spektrum luas, tetapi tidak dengan *cephamycin* dan *carbapenem*, dan dihambat oleh *clavulanat acid*, *tazobactam* dan *imipenem* (Poirel et al., 2000). Tidak seperti kebanyakan ESBL, GES-1 tidak menghidrolisis *aztreonam*. Secara umum, terdapat perbedaan pada beberapa varian GES, beberapa diantaranya termasuk penghasil ESBL dan yang lainnya penghasil *carbapenemase* (Ahmed & Asghar, 2017). GES-2 juga menghidrolisis *carbapenem* dan kurang rentan terhadap inhibitor, GES-4, GES-5, dan GES-6 menghidrolisis *carbapenem* dengan lambat, tetapi GES-4 dapat menghidrolisis *cephamycin*. GES-9, yang berbeda dari GES-1 dengan perubahan tidak menghidrolisis *carbapenem* tetapi dapat melawan *monobactam* (Naas et al, 2008).

Beberapa wabah bakteri gram-negatif penghasil varian GES telah dijelaskan: *Klebsiella pneumoniae* di Korea, Portugal dan Yunani; *Serratia marcescens* di Belanda; dan *P. aeruginosa* di Afrika Selatan. GES-2 adalah contoh ESBL pertama yang dijelaskan yang memperluas spektrum aktivitasnya melawan *carbapenem* dengan mutasi titik tunggal. Selanjutnya, empat varian lain dengan aktivitas *carbapenemase* serupa telah dijelaskan (GES-4, GES-5, GES-6 dan GES-8). Ini mungkin merupakan langkah perantara antara ESBL dan enzim penghidrolisis kelas A *carbapenem* seperti KPC. Faktanya, tipe KPC memiliki sifat yang dibutuhkan untuk disebut ESBL, tetapi juga mampu untuk hidrolisis *carbapenem* yang signifikan (Naas et al., 2008).

D. Pemeriksaan Resistensi Bakteri

1. Uji Konvensional

Tes sensitivitas berfungsi untuk mengetahui tingkat resistensi suatu bakteri terhadap sediaan antibiotik. Beberapa tes sensitivitas diantaranya (Bradford, 2001; CLSI, 2017):

(a) Metode dilusi

Metode dilusi menggunakan pendekatan kuantitatif dengan mencari nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). MIC adalah konsentrasi terendah masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Ada beberapa metode dilusi, yaitu *microboth dilution*, *microdilution*, dan *agar dilution test*.

(b) Metode difusi

Metode difusi yang direkomendasikan adalah teknik *disk diffusion* dengan metode *Muller Hilton Agar* (MHA). Metode ini berdasarkan difusi antimikroba pada agar yang diinokulasi mikroorganisme. Interpretasi hasil *disk diffusion* adalah dengan terbentuknya suatu zona pertumbuhan yang terhambat.

CLSI menjelaskan tentang metode MIC *determination* dan *disk diffusion* dengan menggunakan beberapa mikroba. Hasil positif pada bakteri *P. aeruginosa* jika pengujian menunjukkan :

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints (nearest whole mm)			Interpretive Categories and MIC Breakpoints (µg/mL)		
			S	I	R	S	I	R
PENICILLINS								
O	Piperacillin	100 µg	≥21	15–20	≤14	≤16	32–64	≥128
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS								
A	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	15–20	≤14	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4
B	Ceftiozane-tazobactam	30/10 µg	≥21	17–20	≤16	≤4/4	8/4	≥16/4
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥24	16–23	≤15	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)								
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32
MONOBACTAMS								
B	Aztreonam	30 µg	≥22	16–21	≤15	≤8	16	≥32
CARBAPENEMS								
B	Doripenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8
B	Imipenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8
B	Meropenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8
LIPOPEPTIDES								
O	Colistin	–	–	–	–	≤2	–	≥4
O	Polymyxin B	–	–	–	–	≤2	4	≥8

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints (nearest whole mm)			Interpretive Categories and MIC Breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)		
			S	I	R	S	I	R
AMINOGLYCOSIDES								
A	Gentamicin	10 μg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
A	Tobramycin	10 μg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
B	Amikacin	30 μg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64
O	Netilmicin	30 μg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32
FLUOROQUINOLONES								
B	Ciprofloxacin	5 μg	≥ 21	16–20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
B	Levofloxacin	5 μg	≥ 17	14–16	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8
O	Norfloxacin	10 μg	≥ 17	13–16	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
O	Lomefloxacin	10 μg	≥ 22	19–21	≤ 18	≤ 2	4	≥ 8
O	Ofloxacin	5 μg	≥ 16	13–15	≤ 12	≤ 2	4	≥ 8
O	Gatifloxacin	5 μg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 2	4	≥ 8

Abbreviations: ATCC[®], American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; I, intermediate; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

Tabel 5. Interpretasi metode *disk diffusion* dan MIC *determination*
(CLSI, 2017)

2. Uji Automatik

Serangkaian sistem VITEK (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Prancis) telah menjadi instrumen otomatis yang menyediakan identifikasi spesies (ID) dan pengujian antimikroba kerentanan (AST) untuk berbagai isolat klinis, dan saat ini digunakan di banyak laboratorium mikrobiologi klinis di seluruh dunia. Selama 3 dekade terakhir, beberapa revisi telah diterapkan pada sistem, menghasilkan peningkatan kinerja sistem secara bertahap. Baru-baru ini, revisi ekstensif, termasuk pengenalan ulang pembacaan kolorimetri sebagai pengganti teknologi fluoresensi, dan penambahan beberapa substrat biokimia. (Nakasone, 2007).

Vitek 2-Compact (Biomérieux) memberikan teknik identifikasi spesies yang otomatis, bergantung pada teknologi kolorimetri, pengukuran pelemahan cahaya yang terkait dengan setiap reaksi biokimia dalam kartu *Vitek 2-Compact* (Biomérieux). Kartu tersebut terdiri atas dua jenis, yaitu

kartu ID untuk identifikasi dan kartu *Antibiotic Susceptibility Test* (AST) untuk sensitifitas antibiotik. Setiap kartu dilengkapi dengan *barcode* yang berisi informasi tentang jenis produk, nomor lot, tanggal kedaluwarsa, dan pengenal unik yang dapat ditautkan ke sampel baik sebelum atau setelah memuat kartu ke sistem (Pincus, 2006).

Kartu *Vitek 2-Compact* (Biomerieux) memiliki 64 lubang yang masing-masing dapat berisi substrat uji individu. Substrat tersebut mengukur berbagai aktivitas metabolik seperti pengasaman, alkalinisasi, hidrolisis enzim, dan pertumbuhan dengan adanya zat penghambat. Berikut adalah empat kartu reagen yang tersedia untuk identifikasi kelas organisme yang berbeda sebagai berikut (Pincus, 2006):

- (1) GN - Gram-negatif fermentasi dan basil non-fermentasi.
- (2) GP - Kokus Gram-positif dan basil non-pembentuk spora.
- (3) YST - ragi dan organisme mirip ragi.
- (4) BCL - Gram-positif basil pembentuk spora.

Pada Sistem *Vitek 2-Compact* (Biomerieux), inokulum secara otomatis terisap mengisi sumur-sumur kecil yang mengandung antibiotik dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Kartu yang berisi sumur diinkubasikan pada suhu sesuai kompartemen alat, yang secara optik akan membaca setiap 15 menit. Sejumlah cahaya ditransmisikan pada setiap sumur, kemudian pertumbuhan setiap sumur diukur oleh sistem software menghasilkan data MIC. MIC divalidasi dengan *software Advanced Expert System* (AES) dan menghasilkan pola resistensi

antibiotik (*susceptible*, *intermediate* dan resisten) (Bradford, 2001). Tes lain untuk mendeteksi ESBL secara otomatis diantaranya Microscan (*Siemens Medical Solution Diagnostic*) dan Phoenix (BD *Diagnostic Systems*) (Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

E. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tahun 1983 Kary Mullis menemukan sebuah proses yang dapat membuat salinan gen dalam jumlah tak terbatas, yang sekarang dikenal sebagai *polymerase chain reaction* (PCR). PCR merupakan teknik penggandaan DNA yang digunakan untuk sintesis dan penggandaan jumlah molekul DNA secara *in vitro* pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu relatif singkat. Proses ini dikenal sebagai “reaksi berantai” karena fakta bahwa cetakan DNA asli diperkuat secara eksponensial dalam setiap siklus replikasi. PCR telah dimodifikasi dan digunakan secara luas dalam bidang biologi molekuler, mikrobiologi, genetika, diagnostik, laboratorium klinis, forensik dan lingkungan, serta beberapa aplikasi lain (WHO, 2011).

Prinsip kerja PCR menggunakan satu molekul DNA sebagai cetakan yang akan menghasilkan dua salinan, empat, delapan dan seterusnya. Penggandaan berlangsung dibantu oleh enzim spesifik, yaitu DNA *polymerase*. DNA polimerase bekerja memperpanjang untaian DNA yang tersusun atas nukleotida yang terdiri dari empat basa adenin (A), timin (T), sitosin (C) dan guanin (G). PCR juga membutuhkan fragmen DNA pendek

yang dikenal sebagai primer yang berfungsi menyusun untaian DNA baru serta DNA cetakan. Jika ketiga bahan tersebut tersedia, maka pemanjangan DNA akan dilakukan oleh DNA polimerase (Joshi & Deshpande, 2010).

Proses PCR terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi *template* pada suhu 94-96°C, *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untaian tunggal DNA target pada suhu 40-60°C, dan *extension* (pemanjangan atau polimerisasi) pada suhu 72°C (Joshi & Deshpande, 2010). Berikut tahapan kerja PCR dalam satu siklus :

1. Tahap denaturasi (*melting*)

Tahap dimana sampel dipanaskan untuk memisahkan atau mengubah sifat dua untaian DNA. Proses ini dilakukan pada suhu >90°C (94-96°C) selama 20 detik. Suhu yang tinggi membuat ikatan hidrogen antara untaian DNA terpisah menjadi 2 buah untaian tunggal DNA sehingga menyebabkan DNA menjadi *template* (tempat menempelnya primer) (Anollés, 2013; WHO, 2011).

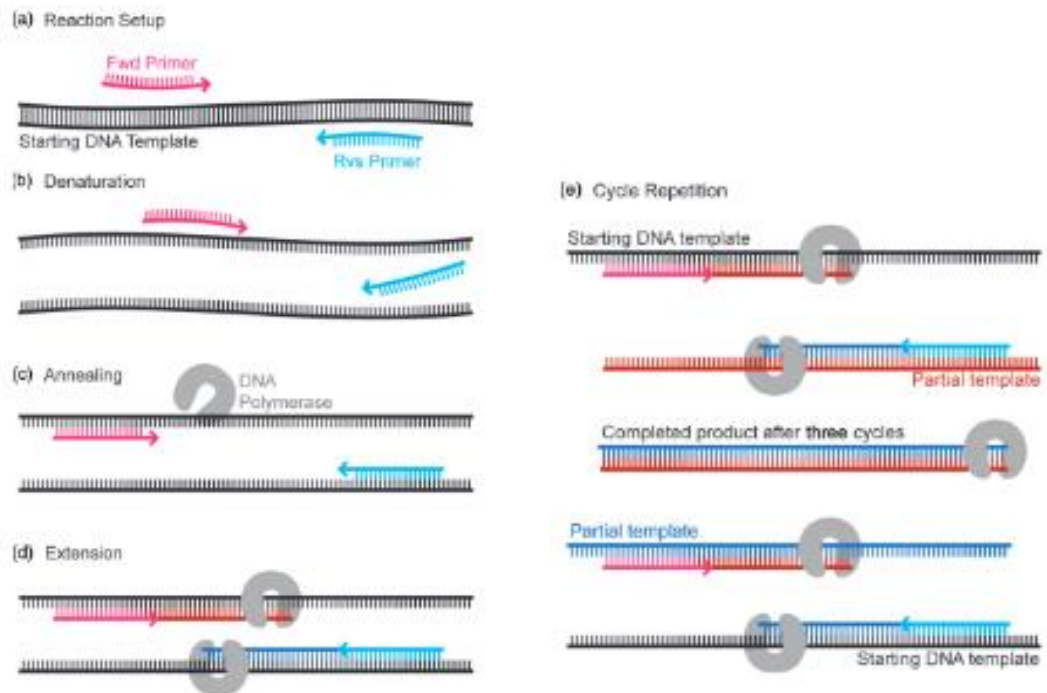
2. Tahap penempelan (*annealing*)

Setelah langkah denaturasi, suhu reaksi diturunkan untuk memungkinkan primer oligonukleotida untuk mengikat untaian tunggal dari DNA template. Tahap annealing merupakan tahap awal sintesis DNA secara *in vitro* dimana primer menempel pada bagian template DNA. Tahap ini dilakukan pada suhu 40-60°C selama 1-2 menit (WHO, 2011).

3. Tahap *ekstension*

Tahap *ekstension* merupakan langkah terakhir dari PCR dimana suhu dinaikkan, biasanya ke 72°C (70-76°C) sehingga memungkinkan enzim DNA *polymerase* untuk mensintesis untai DNA baru yang melengkapi templat DNA. Proses ini dinamakan pemanjangan primer oleh DNA *polymerase*. Pada tahap ini DNA *polymerase* akan memasang dNTP yang sesuai pasangannya (pasangan A adalah T, C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim ini akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lamanya waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi (Anollés, 2013; WHO, 2011).

Biasanya sekitar 25-45 siklus PCR dapat dilakukan tergantung pada jenis PCR yang digunakan, jumlah DNA cetakan awal dan jumlah salinan ampikon yang diinginkan untuk pemrosesan *pasca*-PCR (WHO, 2011).



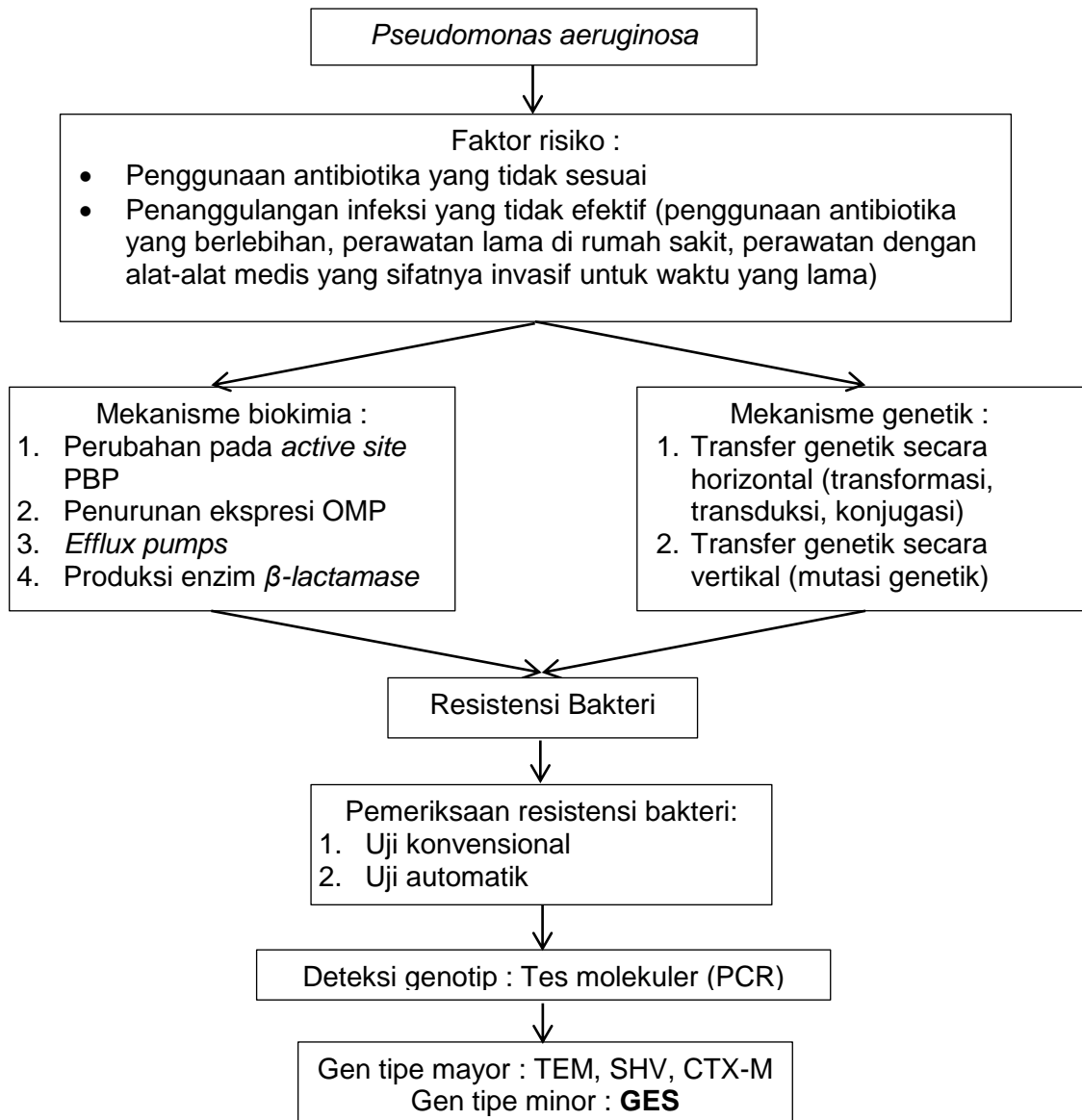
Gambar 4. Prinsip kerja *Polymerase Chain Reaction* (Anollés, 2013)

Tipe ESBL dapat diketahui melalui pemeriksaan genotip (molekuler) dengan PCR sehingga dapat membantu memonitoring ESBL yaitu mengatasi kegagalan pengobatan dan berkontribusi penggunaan antibiotik yang sesuai dan kontrol infeksi (Chong, Yakushiji, Ito, & Kamimura, 2011).

BAB III

KERANGKA PENELITIAN

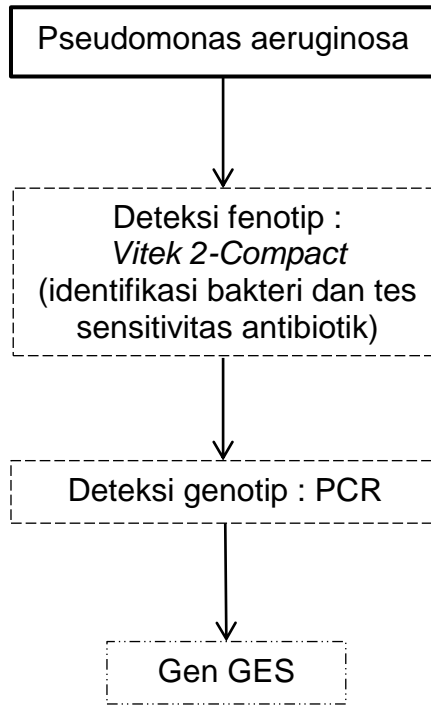
A. Kerangka Teori



Keterangan : PBP = *Penicillin Binding Protein*, OMP = *Outer Membrane Protein*, ESBL = *Extended Spectrum Beta Lactamase*, PCR = *Polymerase Chain Reaction*, TEM = *Temoniera*, SHV = *SulphyDril Variable*, CTX-M = *Cefotaxime Munich*, GES = *Guiana Extended Spectrum*

Gambar 5. Kerangka Teori

B. Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka konsep

Keterangan :



C. Definisi Operasional

- 1) *Pseudomonas aeruginosa* adalah basil gram negatif yang diidentifikasi menggunakan *Vitek 2-Compact*.
- 2) Tes fenotip adalah tes yang menggunakan tes *susceptibilitas* terhadap antibiotik golongan β -*lactam* dengan interpretasi hasil berupa MIC dan

menggunakan *breakpoint* berdasarkan CLSI yang menggunakan *Vitek 2-Compact*.

- 3) Tes genotip adalah tes yang menggunakan alat PCR untuk mendeteksi gen GES. Adanya pita yang sesuai kontrol positif pada masing-masing target menunjukkan hasil positif.
- 4) GES adalah tipe gen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik golongan β -*lactam* dengan menghasilkan enzim β -*lactamase* dengan target *band* 864 bp yang ditentukan dengan metode PCR.