

TESIS

**IDENTIFIKASI GEN RESISTANSI OXA-23 PADA ISOLAT BAKTERI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA DI RUMAH SAKIT UMUM PUSAT Dr.
WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR**

*IDENTIFICATION OF OXA-23 RESISTANCE GENE IN PSEUDOMONAS
AERUGINOSA ISOLATES AT Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO
HOSPITAL MAKASSAR*

**ANDI ZSAZSA RAFIATUL MUKHLIS
P062191004**



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

2022

**IDENTIFIKASI GEN RESISTANSI OXA-23 PADA ISOLAT BAKTERI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA DI RUMAH SAKIT UMUM PUSAT Dr.
WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR**

Tesis
Sebagai Salah Satu Syarat untu Mencapai Gelar Magister

Program Studi
Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

ANDI ZSAZSA RAFIATUL MUKHLIS

Kepada

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

2022

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**IDENTIFIKASI GEN RESISTENSI OXA-23 PADA ISOLAT BAKTERI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA DI RUMAH SAKIT UMUM PUSAT
Dr.WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh:

ANDI ZSAZSA RAFIATUL MUKHLIS

Nomor Pokok : P062191004

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Magister Program **Studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana** Universitas Hasanuddin pada tanggal 26 April 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Komisi Penasehat

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


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

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin


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

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Andi Zsazsa Rafiatul Mukhlis

Nomor Pokok : P062191004

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, 11 Mei 2022



Yang menyatakan,

Andi Zsazsa Rafiatul Mukhlis

PRAKATA

Bismillaahirrahmaanirrahiim

Alhamdulillah Puji Syukur senantiasa penulis panjatkan kehadiran **Allah Subhanahu wa ta'ala** atas segala berkah, Rahmat, Hidayah dan Nikmat-Nya, serta salam dan salawat tercurah kepada junjungan **Nabiullah Muhammad Shallahu 'alaihi wasalam** sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar pendidikan sebagai Magister.

Pertama-tama penulis haturkan ucapan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada orang tua, Ayahanda H. Mukhlis, Sh., MH dan Ibunda Hj. Hasnah yang dengan penuh kasih sayang dan ketulusannya telah memberikan doa dan dukungan yang senantiasa mengiringi langkah penulis selama menempuh pendidikan.

Penyusunan dan penyelesaian tesis ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga penulis dengan rasa syukur menyampaikan terima kasih yang tulus kepada : dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., PhD., Sp.MK selaku Pembimbing 1 dan dr. Firdaus Hamid, Ph.D., Sp.MK selaku pembimbing 2. 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 bimbingan dan ilmunya dengan ikhlas sehingga tesis ini dapat penulis selasaikan dengan baik.

Rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubulu MA, Direktur

Sekolah Pasca Sarja Prof. Dr. Jamaluddin Jompa, Ketua Program Studi S2 Ilmu Biomedik Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc, yang telah memberikan bimbingan dan ilmunya dengan ikhlas sehingga tesis ini dapat penulis selasai dengan baik.

Rasa terima kasih khususnya penulis sampaikan kepada suami dan anak, Andi Nurhaerurrijal Amin, SH dan Andi Mardzia Gumaisha, yang telah banyak memberikan dukungan dan menjadi penyemangat selama penulis menempuh pendidikan. Selain itu, terima kasih pula kepada Wahyunita, Fatmawati Annisa, Ade Rifka Junit, Dewi Mutisari, dan Sri Wahyuni selaku teman seangkatan penulis di program studi mikrobiologi yang telah membantu dan mendorong penulis untuk terus berusaha dalam menyelesaikan tesis ini demi mewujudkan cita-cita untuk memperoleh gelar M.Biomed.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat penulis tuliskan satu persatu, penulis sampaikan rasa terima kasih. Semoga Allah Subhanahu wa ta'ala selalu melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini.

Makassar, 26 April 2022

Andi Zsazsa Rafiatul Mukhlis

ABSTRAK

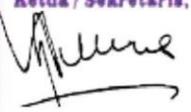
ANDI ZSAZSA RAFIATUL MUKHLIS. *Identifikasi Gen Resistensi OXA-23 pada Isolat Bakteri Pseudomonas aeruginosa di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar (dibimbing oleh Rizalinda Sjahril dan Firdaus Hamid).*

Pseudomonas aeruginosa dikenal sebagai salah satu patogen gram negatif paling umum yang terkait dengan infeksi nosokomial dan menunjukkan resistensi intrinsik tingkat tinggi terhadap obat antibiotik. Peningkatan resistensi dan penyebaran gen resistensi yang sangat luas menyebabkan sulitnya pengobatan terhadap infeksi *P. aeruginosa*. OXA-23 adalah salah satu gen yang menyebabkan resisten terhadap antibiotik karbapenem dan telah banyak ditemukan di beberapa negara.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen OXA-23 pada isolate klinis *P. aeruginosa* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel penelitian yang digunakan adalah 85 isolat klinis *P. aeruginosa* yang berasal dari pasien di Laboratorium Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo yang telah diidentifikasi dan diuji kepekaannya terhadap antimikroba menggunakan VITEK 2 Compact.

Hasil uji fenotip menunjukkan isolat *P. aeruginosa* memiliki tingkat resistensi paling rendah terhadap antibiotik amikasin dan gentamisin masing-masing sebesar 3,5% dan 4,7% sedangkan tingkat resistensi tertinggi terhadap antibiotik imipenem dan *ceftazidime* masing-masing 23,2% dan 27%. Uji genotip menunjukkan 13 (15.3%) isolat *P. aeruginosa* yang positif OXA-23. Sebagai kesimpulan gen OXA-23 terbukti ada dan tersebar pada isolat *P. aeruginosa* di Makassar, Sulawesi Selatan dengan tingkat resistensi yang tinggi terhadap imipenem dan *ceftazidime*.

Kata kunci: *Infeksi nosokomial, Pseudomonas aeruginosa, Polymerase Chain Reaction (PCR), OXA-23.*

 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris,
Tanggal: <u>06/04/2022</u>	



ABSTRACT

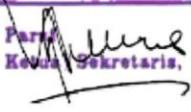
ANDI ZSAZSA RAFIATUL MUKHLIS. *Identification of OXA-23 Resistance Gene in Pseudomonas aeruginosa Isolates at Dr. Wahidin Sudirohusodo Hospital Makassar* (supervised by **Rizalinda Sjahril dan Firdaus Hamid**).

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common gram-negative pathogens associated with nosocomial infections and has high levels of intrinsic antibiotic resistance. Increased resistance and the very widespread resistance genes make it challenging to treat *P. aeruginosa* infection. OXA-23 is one of the genes that cause resistance to carbapenem antibiotics and has been found in several countries.

This study aims to detect the presence of the OXA-23 gene in clinical isolates of *P. aeruginosa* using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The research samples used were 85 clinical isolates of *P. aeruginosa* from patients in the Clinical Laboratory of Dr. Wahidin Sudirohusodo hospital which have been identified and tested for antimicrobial sensitivity using VITEK 2 Compact.

The phenotypic test results revealed that *P. aeruginosa* isolates had the lowest levels of resistance to amikacin and gentamicin antibiotics, 3.5% and 4.7%, respectively, and the highest levels of resistance to imipenem and ceftazidime antibiotics, 23.2% and 27%, respectively. The genotypic test showed 13 (15.3%) isolates of *P. aeruginosa* were positive for OXA-23. In conclusion, the OXA-23 gene was proven to be present and distributed in *P. aeruginosa* isolates in Makassar, South Sulawesi, with a high level of resistance to imipenem and ceftazidime.

Keywords: *Nosocomial infection, Pseudomonas aeruginosa, Polymerase Chain Reaction (PCR), OXA-23.*

	
GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Para Kewas Sekretaris,
Tanggal : <u>06/04/2022</u>	



DAFTAR ISI

PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	6
D. Hipotesis	6
E. Manfaat Penelitian	7
BAB II	8
TINJAUAN PUSTAKA	8
A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
B. Mekanisme resistensi antibiotik	10
C. Karbapenemase	13
D. Pemeriksaan Laboratorium	18
1. Deteksi fenotip	18
2. Deteksi genotip	23
BAB III	26
KERANGKA PENELITIAN	26
A. Kerangka Teori	26
B. Kerangka Konsep	27

BAB IV	28
METODE PENELITIAN.....	28
A. Desain Penelitian	28
B. Tempat dan Waktu Penelitian	28
C. Populasi dan Sampel Penelitian.....	28
D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	29
E. Etik Penelitian	29
F. Cara Kerja.....	30
G. Definisi Operasional	34
H. Analisis Data	35
I. Alur Penelitian	36
BAB V	37
HASIL DAN PEMBAHASAN	37
A. Hasil Penelitian	37
B. Pembahasan.....	46
BAB VI	55
KESIMPULAN DAN SARAN	55
A. Kesimpulan	55
B. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Distribusi Isolat <i>P. aeruginosa</i> berdasarkan jenis kelamin	37
Tabel 2. Distribusi Isolat <i>P. aeruginosa</i> Berdasarkan Usia	38
Tabel 3. Distribusi isolat <i>P. aeruginosa</i> Berdasarkan Spesimen.....	38
Tabel 4. Distribusi isolat <i>P. aeruginosa</i> Berdasarkan Lama Rawat.....	39
Tabel 5. Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik <i>P. aeruginosa</i> Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik	40
Tabel 6. Distribusi Temuan Gen pada Isolat <i>P. aeruginosa</i>	41
Tabel 7. Pola Kepekaan Antibiotik Golongan Karbapenem terhadap gen OXA-23	43
Tabel 8. Kesesuaian temuan gen OXA-23 dengan uji fenotip pada antibiotik golongan karbapenem	44
Tabel 9. Distribusi temuan gen OXA-23 berdasarkan lama perawatan pasien	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media kultur :..	9
Gambar 2. Representasi skematis dari mekanisme utama bakteri dari resistensi antibiotik (González-Bello, 2017)	13
Gambar 3. Proses <i>Polimerase chain reaction</i> (PCR) (Lui <i>et al.</i> , 2009)....	24
Gambar 4. Kerangka Teori	26
Gambar 5. Kerangka Konsep.....	27
Gambar 6. Alur Penelitian	36
Gambar 7. Hasil elektroforesis produk PCR gen OXA-23 dengan marker 501bp.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekomendasi persetujuan Etik	62
Lampiran 2. Gambar Penelitian dan Hasil Elektroforesis	63
Lampiran 3. Tabel Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik dan PCR	67

DAFTAR SINGKATAN

ARI	: Acinetobacter resistant to imipenem
CHDL	: carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DDST	: Double Disc Synergy Test
DNA	: Deoksiribonukleat
DORI	: Doripenem
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ESBL	: Extended spectrum β -lactamase
ESCAPE	: Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa dan spesies Enterobacter
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GES	: Guiana extended spectrum β -lactamase
ICU	: Intensive Care Unit
IMP	: Imipenem
KPC	: Klebsiella pneumoniae carbapenemase
MBL	: Metallo β -lactamase
MDR	: Multi-drug resistance
MIC	: Minimal Inhibitory Concentration
MRP	: Meropenem
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance
NMC	: not metalloenzyme carbapenemase
PCR	: Polymerase chain reaction
PME	: Pseudomonas aeruginosa ESBL

PER : Pseudomonas extended resistance
OXA : Oxacilinase
SHV : Sulfhydryl variable
SME : Serratia marcescens enzyme
TEM : Temoniera
TSIA : Triple Sugar Iron Agar
VIM : Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Resistensi antibiotik pada suatu bakteri dapat disebabkan karena pemberian antibiotik secara irrasional, sehingga menyebabkan antibiotik kehilangan kemampuannya dalam melawan bakteri. Peningkatan masalah resistensi antibiotik salah satunya ditemukan pada bakteri gram negatif yang menyebabkan terjadinya peningkatan pada angka mortalitas, morbiditas dan pembiayaan pada layanan kesehatan.

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam kelompok patogen ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan spesies Enterobacter) yang telah dikenal sebagai salah satu patogen gram negatif paling umum yang terkait dengan infeksi nosokomial dan menunjukkan resistensi intrinsik tingkat tinggi terhadap obat antibiotik dan kemampuan untuk menjadi lebih resistan terhadap obat (!!! INVALID CITATION !!!).

Strain klinis *P. aeruginosa* resisten terhadap banyak kelas agen antibiotik, termasuk β -laktam, aminoglikosida dan fluoroquinolon. Perkembangan resisten patogen ini disebabkan oleh tekanan selektif dari mutasi pada gen kromosom yang menyebabkan produksi β -laktamase spektrum luas (ESBL) dan hiperekspresi AmpC, represi atau inaktivasi oprD, dan ekspresi berlebihan dari *efflux pump* yang pada akhirnya

menyebabkan kegagalan pengobatan (Kothari *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2012).

Mekanisme resistensi yang paling penting terhadap antibiotik β -laktam pada bakteri Gram-negatif adalah inaktivasi enzimatis oleh enzim β -laktamase, enzim ini secara ireversibel membuka cincin β -laktam antibiotik. Karbapenemase merupakan β -laktamase spesifik yang menyebabkan bakteri mengalami resisten terhadap banyak antibiotik, bakteri yang menghasilkan enzim ini tidak hanya menghidrolisis antibiotik karbapenem namun mampu menghidrolisis hampir semua golongan antibiotik β -laktam (Queenan dan Bush, 2007). Antibiotik karbapenem merupakan salah satu antibiotik golongan β -laktam yang sering digunakan sebagai antibiotik "*last line*" atau antibiotik pilihan terakhir ketika tidak terdapat antibiotik lain yang mampu mengobati infeksi tersebut.

Menurut klasifikasi struktur molekuler oleh Ambler pada tahun 1980, β -laktamase dibagi menjadi empat kelompok penamaan yang disesuaikan berdasarkan urutan asam aminonya, terdiri dari kelas A, C dan D yang menggunakan serin pada situs aktifnya, sedangkan kelas B (metalo β -laktamase) menggunakan kation bivalen terutama zink sebagai situs aktifnya (Hall dan Barlow, 2005). Kelas D β -laktamase juga dikenal sebagai enzim tipe OXA atau oksasilinase (OXA) memiliki kemampuan untuk menghidrolisis oksasilin jauh lebih cepat daripada penisilin, benzilpenisilin. Enzim tipe OXA memiliki 350 enzim yang berbeda secara genetik yang tersebar luas diantara bakteri gram negative yang

menantang secara klinis, seperti *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Proteus mirabilis*. Selain itu enzim ini bertanggung jawab atas sebagian besar resistensi terhadap antibiotik β -laktam (Antunes *et al.*, 2014; Leonard *et al.*, 2013). Sebagian besar enzim OXA tertanam dalam kromosom bakteri, tetapi banyak dari gen oksasilinase juga terdapat pada plasmid atau transposon yang memfasilitasi terjadinya penyebaran gen OXA di antara bakteri (Chaudhary dan Payasi, 2014).

Dalam beberapa tahun terakhir, enzim OXA dengan aktivitas karbapenemase telah meningkat dan menjadi krisis kesehatan masyarakat diseluruh dunia, karena kurangnya pengembangan obat antimikroba baru dan penyebarannya yang luas, terutama di beberapa spesies bakteri yang relevan secara klinis, seperti *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* dan *E. coli* (Diene dan Rolain, 2014). Sebagian besar enzim OXA tertanam dalam kromosom bakteri, tetapi banyak dari gen oksasilinase adalah bagian dari kaset gen dalam integron kelas 1 yang umumnya terkait dengan plasmid atau transposon yang memfasilitasi penyebaran gen OXA diantara bakteri (Chaudhary dan Payasi, 2014).

Kelas D β -laktamase dengan aktivitas karbapenemase pertama kali dilaporkan pada tahun 1995 adalah OXA-23 yang terdeteksi pada isolat *A. baumannii* dari Skotlandia yang dimediasi oleh plasmid (Leonard *et al.*, 2013; Poirel *et al.*, 2010). Sejak saat itu telah ditemukan lebih dari 75

varian baru yang menunjukkan resistensi terhadap antibiotik karbapenem yang kemudian dikelompokkan menjadi lima subfamili berbasis urutan, yaitu OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, dan OXA58 (Leonard *et al.*, 2013). OXA-23 dan OXA-24/40 mampu menginduksi resistensi terhadap karbapenem seperti imipenem (IMP), meropenem (MRP, dan doripenem (DRP) (Rouhi dan Ramazanzadeh, 2018). Penelitian yang dilakukan di Iran pada tahun 2015 sampai 2017 pada isolat bakteri *P. aeruginosa* dilaporkan isolate yang resisten terhadap antibiotic IMP terdeteksi mengandung gen OXA-23 sebesar 11.19% (Rouhi dan Ramazanzadeh, 2018). Penelitian di Makassar pada tahun 2019 di RSUP DR. Wahidin Sudirohusodo Makassar melaporkan adanya 56% gen OXA-23 pada bakteri *A. baumannii* (Ridwan, 2019).

Beberapa Negara telah banyak melaporkan adanya gen OXA-23 pada bakteri *P. aeruginosa*, namun hingga saat ini, penulis belum menemukan adanya penelitian mengenai keberadaan gen OXA-23 pada *P. aeruginosa* di Indonesia khususnya daerah Makassar, mengingat pengobatan terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang mengandung enzim OXA menjadi sangat sulit karena meningkatnya kejadian resistensi dan penyebaran gen resistensi yang sangat luas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *P. aeruginosa* yang mengandung gen OXA-23 dan karakteristiknya terhadap antibiotik. Informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk mengonfirmasi secara genotip kasus resistensi yang ada di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo

Makassar pada tahun 2019 dan data tersebut dapat digunakan sebagai dasar dalam pemilihan terapi.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ditemukan gen OXA-23 pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?
2. Bagaimana karakteristik gen OXA-23 terhadap tes sensitivitas antibiotic karbapenem pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?
3. Apakah terdapat hubungan antara temuan gen OXA-23 dengan hasil tes sensitivitas antibiotik pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?
4. Apakah terdapat hubungan antara temuan gen OXA-23 dengan lama perawatan pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui adanya gen OXA-23 pada isolat *P. aeruginosa* pada pasien di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo

2. Tujuan khusus

A. Untuk mengetahui adanya gen OXA-23 pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

B. Untuk mengetahui karakteristik gen OXA-23 terhadap tes sensitivitas antibiotik karbapenem pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

C. Untuk mengetahui hubungan antara temuan gen OXA-23 dengan hasil tes sensitivitas antibiotik pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

D. Untuk mengetahui hubungan antara temuan gen OXA-23 dengan lama perawatan pada isolat *P. aeruginosa* di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo?

D. Hipotesis

Terdapat gen OXA-23 pada isolat bakteri *P. aeruginosa* yang dideteksi menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

E. Manfaat Penelitian

1. Akademik

Sebagai dasar pemikiran dan pertimbangan dalam mengembangkan penelitian lanjutan khususnya mengenai keberadaan gen resistensi menggunakan metode PCR dan mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik.

2. Instansi Kesehatan

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi masukan bagi rumah sakit dalam melakukan penanganan dan pencegahan terhadap penyebaran bakteri *P. aeruginosa* dilingkungan rumah sakit dan menjadi salah satu acuan dalam pemberian terapi pada pasien infeksi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

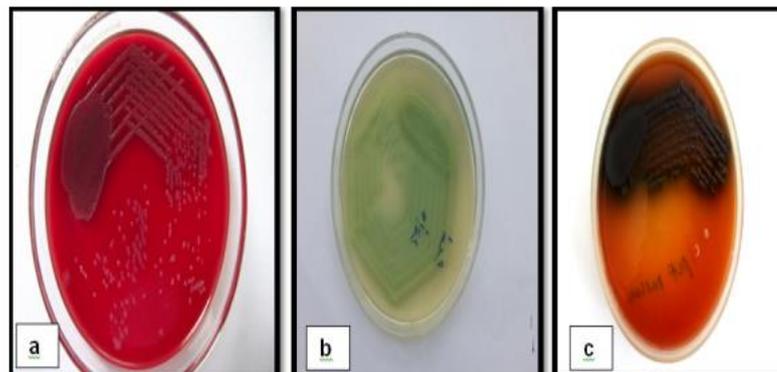
A. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif aerobik yang bersifat nonfermenter dan termasuk bagian dari flora normal usus. Bakteri ini tersebar luas di lingkungan alami (tanah, air permukaan, limbah, tanaman, dan berbagai makanan) dan merupakan patogen oportunistik utama bagi manusia yang bertanggung jawab atas infeksi nosokomial di seluruh dunia dan penyebab spektrum penyakit yang luas (Fazeli *et al.*, 2012). Laporan yang didapatkan oleh *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) mengenai infeksi pada pasien ICU yang terjadi di ruang pembedahan dari tahun 1986 hingga 2003 sebanyak 9,5%, adalah akibat dari bakteri *P. aeruginosa* (Driscoll *et al.*, 2007).

Mikroorganisme ini bersifat nonfermenter, bergerak dengan flagel, dan dapat bertahan hidup dengan tingkat nutrisi yang rendah, serta mampu mentolerir berbagai kondisi fisik sehingga memungkinkannya untuk dapat bertahan di lingkungan komunitas dan rumah sakit (!!! INVALID CITATION !!!). Asetat dan amonia merupakan sumber karbon dan nitrogen bagi *P. aeruginosa* (Latifah, 2014). Organisme ini tumbuh dengan baik pada suhu 25°C hingga 37°C, namun dapat tumbuh lambat atau setidaknya bertahan hidup pada suhu yang lebih tinggi dan lebih rendah. Selain keserbagunaan nutrisinya, *P. aeruginosa* tahan terhadap garam, pewarna, antiseptik lemah, dan banyak antibiotik yang umum

digunakan dalam konsentrasi tinggi. Sifat-sifat ini membantu menjelaskan keberadaanya di mana-mana dan berkontribusi pada keunggulannya sebagai penyebab infeksi nosocomial (Iglewski, 1996).

Tampilan khas koloni *P. aeruginosa* pada *blood agar* : koloni beta-hemolitik besar, tidak teratur, pada *nutrient agar* : koloni besar dan tidak beraturan dengan pigmen kehijauan, pada media *Mac Conkey*: besar, tidak beraturan, koloni yang tidak memfermentasi laktosa (gambar) (Vishwajith *et al.*, 2019)



Gambar 1. Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada media kultur :
a) *Blood agar*, b) *Nutrient agar*, c) *Mac Conkey*

Faktor virulensi bakteri *P.aeruginosa* terdiri dari factor permukaan (flagel, pilus, lipopolisakarida) dan faktor yang disekresikan (produk ekstraseluler, protein sekresi tipe III, molekul quorumsensing, dan alginate) (Kipnis *et al.*, 2006; Sadikot *et al.*, 2005). Infeksi akibat *P. aeruginosa* sulit diobati karena resistensi intrinsiknya yang tinggi serta memiliki kemampuan yang luar biasa dalam memperoleh mekanisme

resistensi lebih lanjut terhadap berbagai kelompok agen antimikroba, hampir semua mekanisme enzim dan mutasi yang diketahui dari resistensi bakteri terdapat pada bakteri *P. aeruginosa* (Ruiz-Roldán et al., 2018; Strateva dan Yordanov, 2009). Perkembangan resistensi pada *P. aeruginosa* adalah multifaktorial dengan mutasi pada gen yang mengkode porins, *efflux pump*, protein pengikat penisilin, dan kromosom β -laktamase, semuanya berkontribusi terhadap resistensi terhadap β -laktam, karbapenem, aminoglikosida, dan fluoroquinolon (Ozer et al., 2009).

B. Mekanisme resistensi antibiotik

Resistensi antibiotik dapat terjadi berdasarkan dua mekanisme, yaitu genetik dan biokimia. Bakteri menggunakan dua strategi genetik utama untuk beradaptasi terhadap “serangan” antibiotik : (1). Evolusi vertikal, adanya mutasi pada kromosom yang terjadi secara spontan atau proses seleksi, dan (2). Evolusi horizontal/*horizontal gene transfer* (HGT) dapat terjadi karena transmisi material genetik dari organisme yang telah resisten. Resistensi bakteri pada semua kelas antibiotik yang berbeda dapat meningkat karena gen resisten yang mampu ditransfer atau ditransmisikan melalui proses konjugasi (plasmid yang pindah dari satu bakteri ke bakteri lain karena adanya perlekatan antara bakteri donor dengan bakteri penerima) , transformasi (bakteri yang lisis melepaskan kromosom DNA dan masuk ke bakteri lain), dan transduksi (ditransfer oleh bakteriofage) (!!! INVALID CITATION !!!).

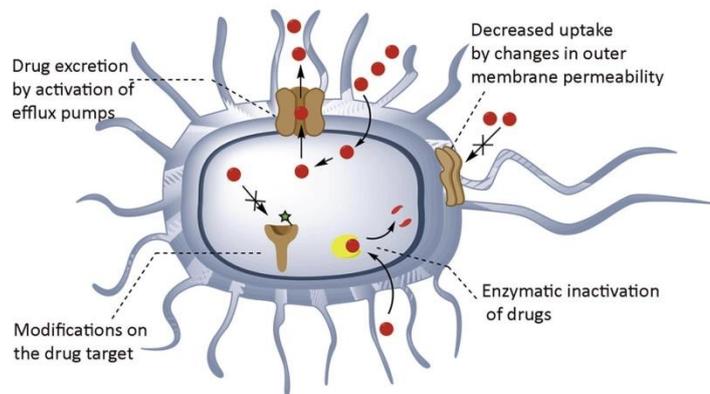
Mekanisme resistensi biokimia antibiotik, terdiri dari (Gambar 1) :

- 1) Inaktivasi antibiotik. Resistensi terhadap antibiotik dapat terjadi karena produksi enzim oleh bakteri yang menyebabkan antibiotik menjadi tidak aktif atau mengalami penurunan fungsi. Enzim β -laktamase merupakan salah satu enzim yang mampu menonaktifkan antibiotik dengan cara memutus cincin β -laktam dari antibiotik β -laktam seperti penisilin, sehingga kerusakan pada cincin β -laktam menghentikan antibiotik untuk dapat menempel pada prekursor peptidoglikan (Dugassa dan Shukuri, 2017; Latifah, 2014).
- 2) Penurunan permeabilitas membran. Cara lain untuk mengganggu kerja antibiotik adalah dengan mencegah masuknya obat ke dalam sel bakteri dan mencapai targetnya. Bakteri gram negatif memiliki pori-pori (saluran kecil) pada dinding selnya yang berfungsi sebagai jalan masuknya antibiotik. Tetapi adanya mutasi gen dapat mengubah muatan listrik atau struktur fisik pori-pori sehingga dapat mempersulit antibiotik untuk masuk ke dalam sel. Antibiotik masih aktif secara fungsional, tetapi akan gagal mencapai situs targetnya (Dugassa dan Shukuri, 2017; González-Bello, 2017).
- 3) Modifikasi situs target. Beberapa antibiotik bekerja dengan mengikat komponen molekul target dari mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menurunkan keefektifan suatu obat jika

molekul target berubah sedikit dalam strukturnya sehingga antibiotik tidak lagi dapat mengikat molekul target tersebut. Contohnya, tetrasiklin memblokir situs akses RNA transfer dengan mengikatnya. Pada gilirannya sedikit perubahan di situs akses dapat menyebabkan resistensi mikroba terhadap tetrasiklin (Dugassa dan Shukuri, 2017).

- 4) *Efflux pump*. Mekanisme lain di mana mikroorganisme menjadi kebal terhadap antibiotik adalah dengan menggunakan *efflux pump*. *Efflux pump* adalah pompa biologis yang dapat memaksa antibiotik keluar dari sel, sehingga tidak dapat mencapai atau tetap bersentuhan dengan targetnya tetapi konsentrasi antibiotik menurun sehingga antibiotik tidak cukup efektif. Metode resistensi antibiotik ini seringkali dapat menciptakan resistensi terhadap lebih dari satu kelas antibiotik, terutama makrolida, tetrasiklin, dan fluoroquinolon karena antibiotik ini menghambat berbagai aspek biosintesis protein dan DNA. Mekanisme resistensi ini sangat penting pada *P. aeruginosa* dan *Acinetobacter spp.* (Dugassa dan Shukuri, 2017; González-Bello, 2017).

MECHANISMS OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS



Gambar 2. Representasi skematis dari mekanisme utama bakteri dari resistensi antibiotik (González-Bello, 2017)

C. Karbapenemase

Beberapa bakteri menghasilkan suatu enzim yang mampu menonaktifkan dan memodifikasi suatu antibiotic secara permanen, salah satunya adalah enzim β -laktamase. Enzim ini bekerja dengan cara menghidrolisis ikatan amida pada cincin β -laktam yang terdapat disemua golongan antibiotic β -laktam (Santajit dan Indrawattana, 2016; Zhao dan Hu, 2010).

Karbapenemase merupakan β -laktamase spesifik yang menyebabkan bakteri mengalami resisten terhadap banyak antibiotik, bakteri yang menghasilkan enzim ini tidak hanya menghidrolisis antibiotik karbapenem namun mampu menghidrolisis hampir semua golongan antibiotik β -laktam (Queenan dan Bush, 2007).

Dua skema klasifikasi β -laktamase yang paling sering digunakan di seluruh dunia adalah klasifikasi molekuler Ambler dan sistem klasifikasi fungsional Bush-Jacoby-Medeiros (Paterson dan Bonomo, 2005). Klasifikasi molekuler didasarkan pada homologi protein (kesamaan asam amino) yang dibagi menjadi empat kelas A-D. Kelas A *extended-spectrum β -lactamase* (ESBL), Kelas C AmpC *β -lactamases*, dan D oksasilinase spektrum luas (OXA) adalah enzim tipe serin yang memiliki bagian serin di situs aktif. Enzim kelas B memerlukan kation divalen (seng) sebagai kofaktor logam sehingga disebut *metallo β -lactamase* (MBL). Skema klasifikasi fungsional Bush-Jacoby-Medeiros mengelompokkan β -laktamase menurut kesamaan fungsional (profil substrat dan inhibitor). Klasifikasi fungsional β -laktamase yang diketahui terbagi menjadi empat kelompok fungsional utama (kelompok 1 hingga 4), dengan beberapa subkelompok di bawah kelompok 2 yang dibedakan menurut substrat spesifik atau profil inhibitor. Dalam skema klasifikasi fungsional ini, karbapenemase ditemukan terutama dalam kelompok 2f dan 3 (Antunes dan Fisher, 2014; Queenan dan Bush, 2007).

Kelas A serin karbapenemase yang terdiri dari enzim NMC/IMI, SME, KPC, dan GES telah terdeteksi pada isolate bakteri *Enterobacteriaceae*. Enzim SME, NMC dan IMI biasanya dikodekan secara kromosom, sedangkan enzim KPC dan GES dikodekan oleh plasmid. Enzim SME-1 (*Serratia marcescens enzyme*) pertama kali terdeteksi di Inggris dari dua isolat *S. marcescens* yang dikumpulkan pada tahun 1982. SME-1 β -

laktamase, bersama dengan SME-2 dan SME-3 yang hampir identik, telah ditemukan secara sporadis di seluruh Amerika Serikat. Enzim IMI (*imipenem-hydrolyzing β -lactamase*) dan NMC (*not metalloenzyme carbapenemase*) telah terdeteksi dalam isolat klinis langka *Enterobacter cloacae* di Amerika Serikat, Prancis, dan Argentina. NMC-A dan IMI-1 memiliki identitas asam amino 97% dan terkait dengan SME-1, dengan sekitar 70% identitas asam amino. Fakta jaranginya ketiga jenis enzim tersebut dilaporkan diseluruh dunia kemungkinan karena enzim ini dikodekan secara kromosom (Diene dan Rolain, 2014; Queenan dan Bush, 2007).

Gen untuk enzim KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) ditemukan pada plasmid yang dapat ditransfer, terutama pada *K. pneumoniae*, tetapi juga telah terdeteksi pada Enterobacteriaceae lain, seperti *P. aeruginosa* dan *A. baumannii*. Anggota pertama dari keluarga KPC ditemukan melalui proyek pengawasan ICARE dalam isolat klinis *K. pneumoniae* dari North Carolina pada tahun 1996. Isolat ini resisten terhadap semua β -laktam yang diuji, tetapi MIC karbapenem menurun dengan adanya asam klavulanat. Gen untuk enzim GES (*Guiana extended spectrum*) pertama kali dijelaskan pada tahun 2000 dalam isolat *K. pneumoniae* dari Guyana Prancis. Enzim GES pada awalnya dilaporkan sebagai ESBLs (*extended-spectrum β -lactamases*), tetapi karena adanya mutasi menyebabkan aktivitas hidrolisis bertambah terhadap karbapenem (GES-2, GES-4, GES-11, dan GES-14). Semua

enzim tersebut memiliki kemampuan untuk menghidrolisis berbagai antibiotik β -laktam, termasuk karbapenem, sefalosporin, penisilin, dan aztreonam, dan semuanya dihambat oleh klavulanat dan tazobactam (Diene dan Rolain, 2014; Queenan dan Bush, 2007).

Kelas B metallo- β -laktamase, anggota ambler kelas B dan Bush-Jacoby-Medeiros grup 3, dibedakan dengan adanya Zn^{2+} di situs aktif. MBL menghidrolisis sebagian besar β -lakta, termasuk karbapenem, tetapi tidak menghidrolisis monobaktam. MBL dapat dihambat oleh inhibitor *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA). Enzim tipe MBL, seperti enzim IMP, VIM, GIM, SIM dan NDM, terutama ditemukan dalam plasmid yang dapat ditransfer diantara bakteri *Enterobacteriaceae*, tetapi juga ditemukan di *P. aeruginosa* dan *A. baumannii*. Enzim tipe IMP, awalnya dilaporkan pada tahun 1991 dalam isolat klinis *S. marcescens* di Jepang, saat ini enzim tersebut telah dilaporkan di seluruh dunia di *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, dan *A. baumannii*. Enzim tipe VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) yang sekarang terdiri dari >30 varian, pertama kali diisolasi di Verona, Italia, pada tahun 1997 pada isolat klinis *P. aeruginosa* dan berada pada integron kelas 1. Enzim NDM-1 telah menyebar ke seluruh dunia dan sekarang menjadi salah satu karbapenemase yang paling umum di semua *Enterobacteriaceae* dan di *A. baumannii* (Diene dan Rolain, 2014).

Kelas D karbapenemase juga dikenal sebagai oksasilinase (OXA), Gen OXA ditemukan pada kromosom serta plasmid dari spesies bakteri

yang beragam seperti *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, dan *Burkholderia*. Banyak kromosom β -laktamase Kelas D sekarang telah ditransfer ke plasmid, dan menimbulkan ancaman klinis yang lebih besar. Tipe OXA yang mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis emipenem dikelompokkan kedalam subgroup β -laktamase yang disebut dengan *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases* (CHDL). Enzim OXA adalah yang paling bervariasi di antara enzim β -laktamase dengan lebih dari 389 jenis urutan yang telah dilaporkan, namun hanya beberapa dari enzim tersebut yang dilaporkan sebagai CHDL, yaitu OXA-23, OXA-24, OXA-58 (Queenan dan Bush, 2007).

- **Gen *blaOXA-23***

β -laktamase pertama dengan aktivitas karbapenemase dilaporkan pada tahun 1993. Enzim dimurnikan dari strain *A. baumannii* yang resisten terhadap berbagai obat yang diisolasi pada tahun 1985 dari seorang pasien di Edinburgh, Skotlandia. Enzim tersebut diberi nama ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*) yang terdapat pada plasmid. Urutan enzim ARI-1 ternyata termasuk dalam keluarga OXA kelas D dari β -laktamase, sehingga enzim tersebut kemudian berganti nama menjadi OXA-23. Terdapat empat transposon yang memiliki hubungan dengan *blaOXA-23*, yaitu Tn2006, Tn2007, Tn2008, dan Tn2009. Gen ini dapat ditemukan pada plasmid maupun kromosom dan berhubungan dengan elemen

genetic ISAba1. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa Tn2006 saat ini merupakan penentu yang paling sering dari resistensi karbapenem dengan kemampuan untuk menyebar ke isolat *A. baumannii* lain (Antunes dan Fisher, 2014). CHDL seperti OXA-23 memberikan resistensi terhadap karbapenem seperti imipenem, meropenem, dan doripenem melalui aktivitas hidrolitik yang lemah terhadap antibiotik tersebut. Jembatan hidrofobik yang dibentuk oleh Tyr112 dan Met223 berperan penting dalam aktivitas karbapenemase enzim OXA-23 (Kaitany *et al.*, 2013).

D. Pemeriksaan Laboratorium

1. Deteksi fenotip

Metode fenotipik merupakan standar emas dalam menentukan resistensi pada isolat klinis. Menurut *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) metode yang paling banyak digunakan untuk uji fenotip ialah metode *disk diffusion* dan metode dilusi atau menurut kriteria dari *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), yaitu E-test, atau *Double Disc Synergy Test* (DDST) (Sittová *et al.*, 2015).

a. Disk Diffusion

Disk diffusion adalah standar emas yang digunakan untuk memastikan resistensi bakteri. *Disk diffusion* standar diperkenalkan

oleh Bauer dan Kirby pada tahun 1956, metode ini menggunakan kertas cakram (*disk*) yang mengandung zat antimikroba untuk menguji apakah bakteri tertentu rentan terhadap antibiotik tertentu atau sebaliknya. Inokulum bakteri (sekitar $1-2 \times 10^8$ CFU/mL) disebarkan secara seragam menggunakan kapas steril pada cawan petri *Mueller Hinton* (MH) agar steril. *Disk* antibiotik ditempatkan di atas permukaan media agar MH. Setiap *disk* harus ditekan ke bawah untuk memastikan kontak penuh dengan permukaan agar. Pelat diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ dalam inkubator bakteriologis sebelum dilakukan interpretasi hasil. Ukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar *disk* diukur; ukuran zona hambat sesuai dengan konsentrasi antibiotik berdasarkan CLSI (Uddhav dan Sivagurunathan, 2016).

b. Metode Dilusi

Metode pengujian ini digunakan untuk menentukan *minimal inhibitory concentration* (MIC) antimikroba untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme (biasanya dinyatakan dalam $\mu\text{g} / \text{ml}$ atau mg / liter) secara kuantitatif. Konsentrasi tersebut dapat dicapai dengan melakukan pengenceran agen antimikroba baik dalam media agar (*agar dilution*) maupun media kaldu (*broth dilution*) (Soleha, 2015).

c. *Epsilometer test* (Etest)

Epsilometer test (Etest) adalah salah satu tes yang digunakan untuk analisis rutin resistensi antibiotik yang meluas pada bakteri. AB BIODISK memproduksi strip plastik Etest pertama untuk memeriksa beberapa antibiotik pada satu platform pada tahun 199. Strip plastik Etest dilapisi dengan konsentrasi antibiotik yang telah ditentukan sebelumnya, dan rentang MIC interpretatif yang sesuai masing-masing ditandai pada permukaan dan belakang strip. Deteksi dilakukan dengan meletakkan beberapa strip pada cawan agar yang telah diinokulasi sebelumnya, diikuti dengan inkubasi semalaman; zona hambat elips muncul di sekitar strip, menunjukkan MIC di titik persimpangan antara zona inhibisi dan tepi strip. Kemampuan interpretasi MIC yang mudah dalam kondisi fisik yang beragam menjadikan Etest metode preferensial daripada teknik difusi dan pengenceran cakram standar di laboratorium klinis untuk uji kepekaan antibiotik (Khan *et al.*, 2019).

d. *Double Disc Synergy Test* (DDST)

Tes ini pertama kali digunakan pada studi epidemiologi untuk menilai penyebaran bakteri Enterobacteriaceae penghasil ESBL di rumah sakit Prancis. DDST telah terbukti bekerja dengan baik dengan berbagai spesies Enterobacteriaceae dan jenis ESBL, tes ini telah umum digunakan dan dapat diandalkan dalam mendeteksi ESBL. Pengujian dilakukan pada agar dengan cakram 30 µg sefotaksim (dan

/ atau seftriakson dan / atau seftazidim dan / atau aztreonam) dan cakram amoksisilin-klavulanat (berisi 10 µg klavulanat) yang ditempatkan pada jarak 30 mm (pusat ke pusat), yaitu pada jarak yang disediakan oleh beberapa jenis dispenser disk (Drieux *et al.*, 2008)

e. Teknik otomatis

Perkembangan teknologi otomatis untuk uji resistensi antibiotik telah diimprovisasi secara terus menerus dan telah menggantikan metode fenotipik konvensional. Otomatisasi dan kesederhanaan menjadi alasan utama diterimanya teknik otomatis secara luas dalam diagnostik. Integrasi komputer telah memungkinkan analisis online dan berbagi data, yang merupakan inovasi besar untuk validasi hasil, terutama di daerah terpencil. Di antara sistem otomatis yang dikembangkan, yaitu *MicroScan WalkAway* (Beckman Coulter, Inc. Atlanta, Georgia, USA) (1980), *Micronaut* (Merlin, Berlin, Jerman) (1990), tes *avantage* (Abbott Laboratories, Irving, Texas, USA) (1980), *Vitek 2* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Prancis) (2000), *Phoenix* (BD Diagnostics, Franklin Lakes, New Jersey, USA) (2001), dan *Sensititre ARIS 2X* (Sistem Diagnostik Trek, Desa Oakwood, Ohio, AS) (2004). *Vitek* dan *Phoenix* mendeteksi bakteri yang tumbuh berdasarkan kekeruhan, sedangkan sistem otomatis seperti *MicroScan WalkAway* (Beckman Coulter, Inc. Atlanta, Georgia, AS) dan *Sensititre ARIS 2X*

didasarkan pada emisi fluoresensi dari bakteri yang sedang tumbuh (Khan *et al.*, 2019).

- Tinjauan Umum VITEK 2

Sistem VITEK 2 (bio-Mérieux, Prancis) merupakan system identifikasi mikroba secara otomatis yang mengeluarkan hasil lebih cepat, akurat dan berbasis komputer. VITEK 2 menawarkan platform teknologi canggih untuk metode identifikasi fenotipik. Tekhnologi ini memiliki tahapan pemeriksaan yang mudah untuk digunakan dalam memperoleh hasil identifikasi dan kepekaan (sensitifitas) antibiotik yang telah divalidasi dan diinterpretasikan sesuai dengan standar internasional (CLSI = *Clinical laboratory Standard International*) (Prihatini *et al.*, 2007; Sony dan Potty, 2017).

Kartu VITEK 2 terdiri atas 2 jenis kartu, yaitu kartu ID untuk identifikasi dan kartu AST untuk uji kepekaan atau sensitifitas antibiotic dimana setiap kartu dilengkapi dengan angka sandi batang (barcode). Kartu VITEK 2 memiliki konsep yang unik yaitu kombinasi 600 jenis substrat uji kolorimetrik yang sangat khas (spesifik) yang mampu digunakan untuk membedakan antar spesies, sehingga 98% isolat klinik dapat terdeteksi dengan sistem tunggal ini secara cepat. Menu kartu Vitek-2 sangat lengkap, terdiri dari jenis kartu, ketepatan identifikasi dan waktu deteksi (Prihatini *et al.*, 2007).

Tabel 1. Jumlah taksa, ketepatan dan waktu menemukan (deteksi)³

Nama Kartu	Jumlah taksa	Ketepatan hasil	Waktu deteksi
Vitek 2 GN (Gram Negatif)	159	96,8 %	2-10 jam
Vitek 2 GP (Gram Positif)	123	96,5 %	2-8 jam
Vitek 2 YST (Yeast)	52	98,6 %	18 jam
Vitek 2 NH (<i>Neisseria/Haemophilus/fastidious</i> lain)	26	96,5 %	6 jam
Vitek 2 ANC (Anaerob/ <i>Corynebac. t</i>)	66		
Vitek 2 BCL (<i>Bacillus</i>)	42	100% (<i>B. anthracis</i>)	12-14 jam

Sumber : (Prihatini *et al.*, 2007)

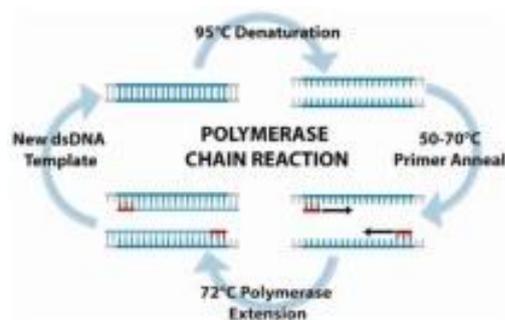
2. Deteksi genotip

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode molekuler untuk sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* menggunakan sepasang primer yang spesifik. metode ini telah diterima secara luas di banyak bidang biologi molekuler (Gibbs, 1990).

Tujuh komponen yang diperlukan dalam proses PCR, yaitu (1) *template*/cetakan DNA yang akan diperbanyak, (2) enzim DNA polimerase tahan panas, (3) satu pasang primer, (4) dNTP (Deoxynucleotide triphosphates), (5) kofaktor MgCl₂, (6) larutan penyangga dan (7) air. Ketujuh komponen tadi dicampurkan di dalam tubung ukuran 200 µL dalam kondisi dingin sebelum dilakukan PCR di dalam mesin *thermal cycler* (Budiarto, 2016).

Protokol standar pada proses PCR terdiri dari 3 tahapan yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat, yaitu : 1. Denaturasi DNA template merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Pada proses ini suhu reaksi meningkat

hingga 95° C untuk memisahkan untai DNA; 2. Penempelan primer pada templat (*annealing*), suhu diturunkan untuk memfasilitasi penempelan DNA polymerase secara spesifik pada untas tunggal DNA yang sudah berkomplementasi dengan primer spesifiknya. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50-60°C; 3. pemanjangan primer (*extension*), selama tahap ini *taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Suhu dinaikkan menjadi 72°C yang optimal bagi enzim DNA polymerase untuk ekstensi primer. Proses ini terjadi secara berulang (siklus), dan setiap siklusnya terjadi duplikasi jumlah DNA (Gambar 2) (Lui *et al.*, 2009).



Gambar 3. Proses *Polimerase chain reaction* (PCR) (Lui *et al.*, 2009).

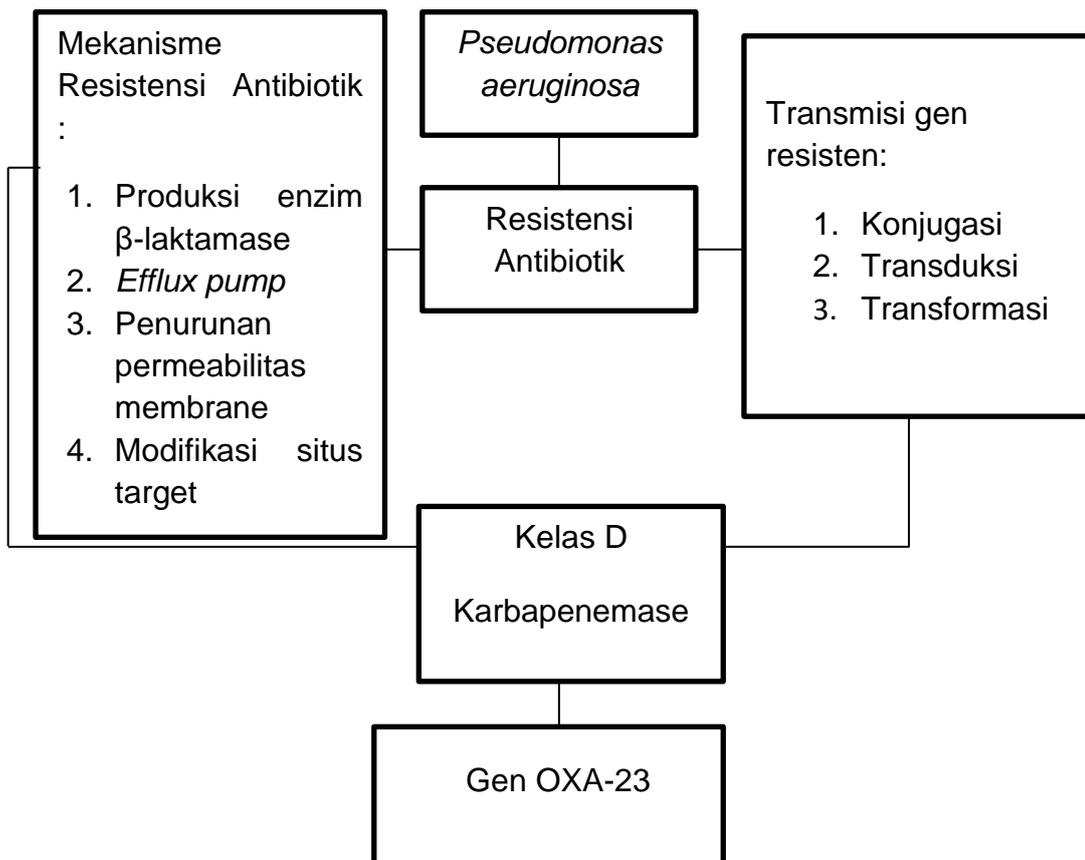
Prinsip PCR didasarkan pada isolasi, amplifikasi, dan kuantifikasi sekuens DNA pendek yang unik yang terdapat dalam materi genetik bakteri target. Untuk PCR konvensional, primer *forward* dan *reverse* digunakan untuk memperkuat urutan target, dan elektroforesis gel

berhubungan dengan pewarna fluoresen pengikat DNA yang memungkinkan visualisasi hasil.

BAB III

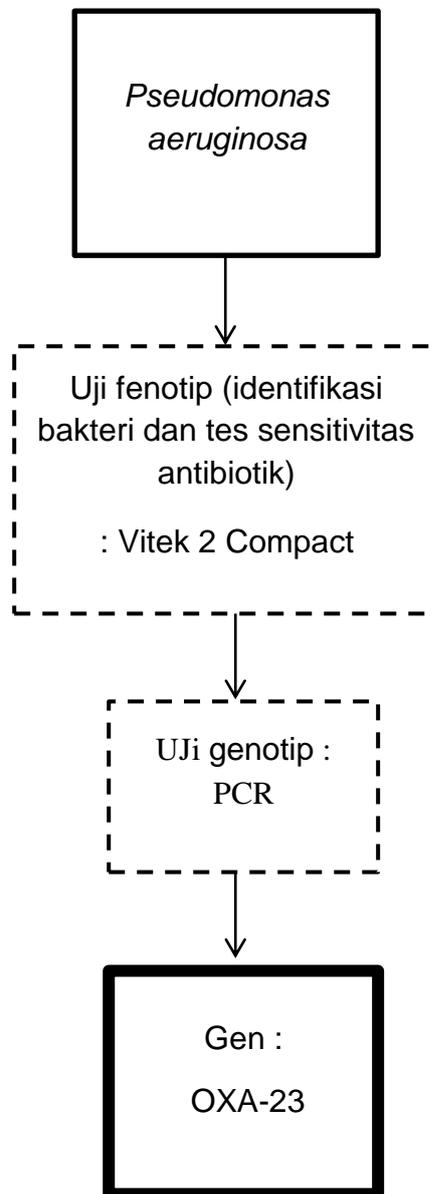
KERANGKA PENELITIAN

A. Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

B. Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka Konsep

Keterangan

Variabel bebas

Variabel antara

Variabel tergantung