

**DETEKSI GEN PENGKODE PORIN OprD PADA
ISOLAT *Pseudomonas aeruginosa*
DI RUMAH SAKIT PENDIDIKAN UNIVERSITAS
HASANUDDIN MAKASSAR DAN RUMAH SAKIT
JEJARINGNYA**

*Detection of OprD Porin Encoding Gene in Pseudomonas
aeruginosa Isolates at Hasanuddin University Teaching
Hospital Makassar and its Network Hospitals*



Oleh:

**Arthur Hugo
C195192003**

Pembimbing 1:

dr. Yoeke Dewi Rasita, M.Ked.Klin, Sp.MK

Pembimbing 2:

Prof. Dr. dr. Mochammad Hatta, PhD, Sp.MK., Bakt. (K)

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI KLINIK
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**DETEKSI GEN PENGKODE PORIN OPRD PADA
ISOLAT *Pseudomonas aeruginosa*
DI RUMAH SAKIT PENDIDIKAN UNIVERSITAS
HASANUDDIN MAKASSAR DAN RUMAH SAKIT
JEJARINGNYA**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis

Program Studi Mikrobiologi Klinik

Disusun dan diajukan oleh

ARTHUR HUGO

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS MIKROBIOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

2023

KARYA AKHIR

**Deteksi Gen Pengkode Porin OprD pada
Isolat *Pseudomonas aeruginosa*
di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan
Rumah Sakit Jejarungnya**

Disusun dan diajukan oleh :

ARTHUR HUGO

Nomor Pokok : C195192003

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada Tanggal 27 Juni 2023

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

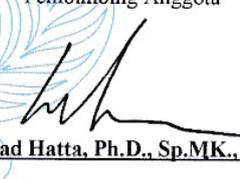
Menyetujui

Komisi Penasehat

Pembimbing Utama

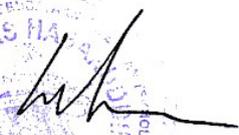
Pembimbing Anggota


dr. Yoeke Dewi Rasita, M.Med.Klin., Sp.MK


Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK., Subsp. Bakt. (K)

Kepala Program Studi
Mikrobiologi Klinik UNHAS

Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS


**Prof. dr. Mochammad Hatta, Plt.D., Sp.MK.,
Subsp. Bakt. (K)**
NIP. 19570416 198503 1 001


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes., Sp.PD-KGH., Sp.GK.
NIP. 19680530 199603 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : **Arthur Hugo**

Nomor Pokok : **C195192003**

Program Studi : **Mikrobiologi Klinik**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “ Deteksi gen pengkode porin oprD pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan Rumah Sakit Jejaringnya” ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 Juni 2023

Yang menyatakan,



Arthur Hugo

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur terhadap Tuhan Yang Maha Esa karena kasih karuniaNya maka tesis berjudul “ Deteksi gen pengkode porin oprD pada isolat *Pseudomonas aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan Rumah Sakit Jejaringnya” ini dapat diselesaikan.

Hal yang mendasari dilakukannya penelitian ini adalah karena munculnya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang resisten terhadap antibiotik karbapenem yang diketahui merupakan antibiotik terbaru yang dikembangkan untuk mengobati infeksi baik bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Studi ini berusaha menyajikan data resistensi *P. aeruginosa* secara fenotipik terhadap antibiotik golongan karbapenem dan data genotipik yang juga dapat dibawa oleh bakteri ini yaitu gen pengkode resistensi karbapenem dan gen pengkode porin OprD. Dengan diketahuinya data resistensi ini dapat menjadi acuan para klinisi untuk memilih antibiotik yang tepat dalam pengobatan pasien.

Dengan selesainya penulisan tesis ini saya ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu saya selama melakukan penelitian dan penulisan tesis ini. Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK, Subsp. Bakt. (K) selaku Pembimbing II tesis dan Ketua Program Studi Mikrobiologi Klinik Unhas, juga kepada dr. Yoeke D. Rasita, M.Med.Klin., Sp.MK selaku pembimbing I tesis sekaligus pembimbing akademik selama saya menjalani pendidikan. Terima kasih juga saya ucapkan kepada para dr. Baedah Madjid, Sp.MK, Subsp. Vir. (K), dr. Rizalinda Sjahril, Ph.D, Sp.MK, Subsp. Vir (K), dan Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, yang telah membimbing sekaligus menjadi penguji dalam menyelesaikan tesis ini. Secara khusus saya juga berterima kasih kepada Bupati dan Pemda Halmahera barat yang telah membiayai pendidikan dokter spesialis beserta penelitian sampai penulisan tesis ini. Saya juga sangat berterima kasih kepada istri tercinta Ailien Ch. Manufuri dan kedua orang tua saya yang telah memberi dukungan tanpa henti dan doa hingga terselesainya tesis ini.

Tidak lupa saya ucapkan terima kasih kepada bapak Syafri, S.AMAK dan Nur Hikmawati, A.Md.Kes selaku analis yang telah banyak membantu saya selama melakukan penelitian.

Kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini namun tidak saya sebutkan, saya mengucapkan banyak terima kasih. Semoga dengan selesainya tesis ini dapat memberikan banyak manfaat bagi pembacanya.

Makassar, 20 Juni 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arthur Hugo', written over a vertical line.

Arthur Hugo

ABSTRAK

ARTHUR HUGO. *Deteksi Gen Pongode Porin OprD pada Isolat Pseudomonas aeruginosa di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan Rumah Sakit Jejarungnya* (dibimbing oleh Yoeke D. Rasita, Mochammad Hatta, Rizalinda Sjahril, Baedah Madjid, dan Ilhamjaya Patellongi).

Resistensi karbapenem pada *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) saat ini merupakan salah satu prioritas utama yang dikaji oleh badan kesehatan dunia (WHO). Penghilangan atau pengurangan fungsi Porin OprD oleh *P. aeruginosa* merupakan salah satu mekanisme yang berperan dalam resistensi karbapenem selain mekanisme enzimatik serta beberapa mekanisme resistensi lainnya akibat tekanan selektif golongan karbapenem terhadap bakteri ini. Studi ini menyajikan data resistensi *P. aeruginosa* terhadap golongan karbapenem yang dikumpulkan dari dua rumah sakit pendidikan di wilayah Makassar, Sulawesi Selatan, baik secara fenotip maupun genotip, serta mendeteksi gen pengode porin OprD pada *P. aeruginosa*. Sebanyak 97 isolat *P. aeruginosa* yang dikumpulkan sejak Desember 2022 sampai dengan Juni 2023 menggunakan metode deskriptif potong lintang. Data diambil dari Rumah Sakit Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo Makassar. Seluruh isolat ini telah diketahui sensitivitas dan resistensinya terhadap imipenem dan meropenem secara fenotip. Kemudian, diuji kembali dengan uji biokimia sebagai tes konfirmasi dan pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen pengode Porin OprD, dan gen karbapenemase IMP, VIM, OXA-48, OXA-51 dan OXA-23 yang dibawa oleh bakteri ini. Dari 97 isolat *P. aeruginosa* resisten karbapenem (CRPA), secara fenotip terdapat 24 (24,7%) isolat resisten terhadap imipenem sekaligus meropenem. Pada pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) ditemukan sebanyak 14,4% isolat terdeteksi memiliki gen pengode karbapenemase IMP, 1% OXA-48, dan 1% OXA-51, dan hanya 1% dari seluruh isolat yang tidak memiliki gen pengode porin OprD. Data resistensi karbapenem dan perubahan pada Porin OprD *P. aeruginosa* diharapkan menjadi acuan sebagai pertimbangan para klinisi dalam pemberian antibiotik golongan karbapenem di rumah sakit, khususnya di wilayah Makassar, Sulawesi Selatan.

Kata kunci: CRPA, Porin OprD, *Pseudomonas aeruginosa*



ABSTRACT

ARTHUR HUGO. *Detection of OprD Porin Encoding Gene in Pseudomonas Aeruginosa University Teaching Hospital, Makassar and Its Network Hospitals* (supervised by Yoeke D. Rasita, Mochammad Hatta, Rizalinda Sjahril, Baedah Madjid, and Ilhamjaya Patellongi)

Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is currently one of the main priorities studied by the World Health Organization (WHO). The deletion or reduction of Porin OprD function by *P. aeruginosa* is one of the mechanisms that plays a role in carbapenem resistance in addition to enzymatic mechanisms and several other resistance mechanisms due to selective pressure of the carbapenem class on these bacteria. This study presented data of the resistance of *P. aeruginosa* to carbapenems collected from two teaching hospitals in Makassar region, South Sulawesi, both phenotypically and genotypically, and detected the OprD porin coding gene in *P. aeruginosa*. A total of 97 *P. aeruginosa* isolates collected from December 2022 to June 2023 using descriptive cross-sectional method were taken from Hasanuddin University Faculty of Medicine teaching hospital and Wahidin Sudirohusodo hospital Makassar. All of these isolates having been known their sensitivity and resistance towards imipenem and meropenem phenotypically were then tested again with biochemical tests as a confirmation test, and PCR examination to detect the Porin OprD coding gene, and the carbapenemase genes IMP, VIM, OXA-48, OXA-51 and OXA-23 carried by these bacteria. The results show that of the 97 isolates of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA), 24 (24.7%) isolates are phenotypically resistant to both imipenem and meropenem. On polymerase chain reaction (PCR) examination, 14.4% of isolates are detected to have carbapenemase coding genes IMP, 1% OXA-48 and 1% OXA-51, and only 1% of all isolates do not have OprD porin coding gene. Carbapenem resistance data and changes in the OprD porin of *P. aeruginosa* are expected to be a reference for consideration of clinicians in the administration of carbapenem group antibiotics in hospitals, especially in the Makassar region, South Sulawesi.

Keyword: CRPA, OprD porins, *Pseudomonas aeruginosa*



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
KATA PENGANTAR.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN DAN LAMBANG	xv
BAB I.....	1
Latar Belakang Masalah	1
Rumusan Masalah.....	4
Pertanyaan Penelitian.....	4
Tujuan Penelitian	5
1.1.1 Tujuan Umum	5
1.1.2 Tujuan Khusus.....	5
Manfaat Penelitian	5
1.1.3 Manfaat Akademik.....	5
1.1.4 Manfaat Untuk Instansi Kesehatan	5
1.1.5 Manfaat Untuk Peneliti.....	6
1.1.6 Ruang Lingkup Peneltian.....	6
Kebaruan Penelitian	6
BAB II.....	8
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.1.1 Klasifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.1.2 Karakteristik <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.1.3 Faktor Viruensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.1.4 Pengambilan sampel <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.1.5 Genetik <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.1.6 Patogenesis pada Infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.1.7 Gambaran Klinis Pada Infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Resisten Karbapenem	18

2.2.1	Definisi Antibiotik	18
2.2.2	Mekanisme Resistensi Antibiotik	18
2.2.3	Mekanisme Resistensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Terhadap Golongan Karbapenem	21
2.3	Porin OprD	22
2.3.1	Definisi.....	22
2.3.2	Struktur OprD	23
2.3.3	Peran OprD Pada Resistensi Karbapenem	23
2.3.4	Deteksi 16S rRNA <i>P. aeruginosa</i>	24
2.3.5	Deteksi Gen Pengkode oprD <i>P. aeruginosa</i>	25
2.3.6	Deteksi Ekspresi gen oprD <i>P. aeruginosa</i>	25
2.4	Kerangka Teori	26
BAB III	27
3.1	Kerangka Konsep	27
3.2	Definisi Operasional	27
3.2.1	Isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.2.2	Resistensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Penghasil Karbapenemase 28	
3.2.3	Gen oprD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
BAB IV	29
4.1	Jenis Penelitian	29
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
4.2.1	Waktu Penelitian.....	29
4.2.2	Tempat Penelitian.....	29
4.3	Populasi dan Subjek Penelitian	29
4.3.1	Populasi Penelitian	29
4.3.2	Subyek Penelitian	30
4.4	Kriteria Subyek Penelitian.....	30
4.4.1	Kriteria Inklusi Subyek Penelitian.....	30
4.4.2	Kriteria Eksklusi Subyek Penelitian.....	30
4.5	Jumlah Subyek Penelitian	30
4.6	Cara Pengambilan subyek penelitian	31
4.7	Alur Penelitian	32
4.8	Prosedur Penelitian	33
4.8.1	Inokulasi pada Medium MacConkey	33
4.8.2	Tes katalase, Oksidase dan Tes Biokimia Lainnya.....	34

4.8.3	Ekstraksi DNA	38
4.8.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	39
4.8.5	Gel Elektroforesis	40
4.9	Alat dan Bahan Penelitian	42
4.9.1	Alat-alat Penelitian.....	42
4.9.2	Bahan-bahan Penelitian	42
4.10	Cara Pengambilan Data	42
4.11	Pengolahan dan Analisa Data	43
4.12	Aspek Etika Penelitian	43
BAB V	44
5.1	Hasil Penelitian.....	44
5.2	Pembahasan	51
5.3	Hambatan Penelitian	53
BAB VI	55
6.1	Kesimpulan.....	55
6.2	Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	62
Lampiran 1.	Jadwal Penelitian.....	62
Lampiran 2.	Biodata Peneliti Utama	63
Lampiran 3.	Persetujuan Komite Etik Universitas Hasanuddin	65
Lampiran 4.	Izin Dirut RSPTN UNHAS untuk Melakukan Penelitian .	66
Lampiran 5.	Izin Dirut RSUP Wahidin Sudirohusodo untuk Melakukan Penelitian.....	67
Lampiran 6.	Hasil BLAST Primer Gen 16S rRNA <i>P. aeruginosa</i>	68
Lampiran 7.	Hasil BLAST Primer Gen oprD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Lampiran 8.	Data penelitian.....	75
Lampiran 9.	Data hasil PCR gen 16S rDNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Lampiran 10.	Data hasil PCR gen 16S rRNA oprD <i>P. aeruginosa</i>	78

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Faktor virulensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Jurado- Martín et al., 2021).....	10
Tabel 5.1	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan asal Rumah Sakit.....	Error!
	Bookmark not defined.	
Tabel 5.2	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan kategori penyakit.....	44
Tabel 5.3	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan kejadian infeksi pada ruang perawatan intensif.....	45
Tabel 5.4	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan kejadian infeksi pada ruang perawatan non-intensif.....	45
Tabel 5.5	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan jenis spesimen.....	46
Tabel 5.6	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan metode identifikasi fenotipik dan uji sensitivitas antibiotik otomatis terdahulu.....	46
Tabel 5.7	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tersimpan pada dua Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan uji sensitivitas antibiotik otomatis terdahulu.....	47
Tabel 5.8	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember	

	2022-Juni 2023, berdasarkan hasil tes konfirmasi secara fenotipik.	48
Tabel 5.9	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan hasil pemeriksaan PCR keberadaan 16S rDNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
Tabel 5.10	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya periode Desember 2022-Juni 2023, berdasarkan hasil pemeriksaan PCR keberadaan gen oprD <i>P. aeruginosa</i>	49
Tabel 5.11	Distribusi isolat tersimpan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> berdasarkan pertumbuhan pada media Mac Conkey di Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya, peridode Juni – Desember 2022.	49
Tabel 5.12	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> yang membawa gen pengkode karbapenemase di Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya, peridode Juni – Desember 2022...	50
Tabel 5.13	Distribusi isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> yang membawa gen pengkode karbapenemase dan/atau gen pengkode oprD berdasarkan profil sentifitas dan resistensi fenotipik di Rumah Sakit Pendidikan UNHAS dan jejaringnya, peridode Juni – Desember 2022.	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 2.1	Skema dari faktor virulensi utama yang digunakan oleh <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Gambar 2.2.	Lokasi target antibiotik dan mekanisme potensial resistensi bakteri terhadap agen antibiotik.....	Error!
	Bookmark not defined.	
Gambar 2.2.	Lokasi target antibiotik dan mekanisme potensial resistensi bakteri terhadap agen antibiotik.....	20
Gambar 2.3	Pengaruh tekanan selektif antibiotik pada bakteri menyebabkan mutasi strain resisten.....	Error!
	Bookmark not defined.	
Gambar 2.3	Pengaruh tekanan selektif antibiotik pada bakteri menyebabkan mutasi strain resisten.....	20
Gambar 2.4	Beberapa mekanisme yang terlibat pada resistensi pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Error!
	Bookmark not defined.	
Gambar 2.4	Beberapa mekanisme yang terlibat pada resistensi pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Gambar 2.5	Sketsa struktur OprD.	Error!
	Bookmark not defined.	
Gambar 2.6	Kerangka teori Infeksi jangka panjang.....	26
Gambar 2.6	Kerangka teori.....	26
Gambar 3.1	Kerangka Konsep.....	27
Gambar 4.1	Alur penelitian.....	32
Gambar 5.1	Isolat dengan nomor A55 pada tidak terdeteksi gen 16S rRNA oprD yang berukuran 242bp.....	49

DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN DAN LAMBANG

Istilah, singkatan dan lambang	Arti dan penjelasan
%	persen
°	derajat
µl	mikroliter
ml	mililiter
ADP	<i>Adenosin Diphosphate</i>
AMR	<i>Antimikrobia Resistance</i>
BAP	<i>Blood Agar Plate</i>
BHI broth	Kaldu <i>Brain Heart Infusion</i>
BHIB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BSC	<i>Biosafety Cabinet</i>
Buffer GSB	Buffer pada proses ekstraksi DNA
Buffer TBE	Buffer pada proses ekstraksi DNA
Buffer W1	Buffer pada proses ekstraksi DNA untuk pencucian
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CRPA	<i>Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dnase	Deoxyribonucleicase
ECDC	<i>European Centers for Disease Control and Prevention</i>
EPS	Exopolysaccharide
GelDoc XR	Merk alat gel elektroforesis
H ₂ O	Rumus kimia air
H ₂ O ₂	Rumus kimia peroksida
HAIs	Hospital Acquired Infections
ICU	Intensive Care Unit
ISK	Infeksi Saluran Kemih
kDa	Kilo Dalton
LCS	Liquor Cerebrospinal
LPS	Lypopolysaccharide
M100	Standar kinerja untuk pengujian kerentanan antimikroba yang dikeluarkan CLSI
MAC	Mac Conkey Agar
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MEP	<i>Mucoid Exopolysaccharide</i>
MexA	Pompa efluks A
MexAB-OprM	Pompa efluks AB, porin M
MexB	Pompa efluks B
MexXY-OprM	Pompa efluks XY, porin M

MHA	Muller Hinton Agar
O ₂	Rumus kimia oksigen
OMP	<i>Outer Membran Protein</i>
OprD	<i>Outer Membran Protein</i> Porin D
OprD ₂	<i>Outer Membran Protein</i> Porin D ₂
OprM	<i>Outer Membran Protein</i> Porin M
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RL	Rhamnolipid
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSUH	Rumah Sakit Universitas Hasanuddin
RSWS	Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo
T1SS	<i>Type 1 Secretion System</i>
T2SS	<i>Type 2 Secretion System</i>
T3SS	<i>Type 3 Secretion System</i>
T5SS	<i>Type 5 Secretion System</i>
T6SS	<i>Type 6 Secretion System</i>
UV	Ultraviolet
VAP	<i>Ventilator Associated Pneumonia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

Latar Belakang Masalah

Resistensi terhadap antibiotik dapat terjadi ketika bakteri berubah dari waktu ke waktu dan tidak lagi merespons antibiotik yang dirancang untuk membunuh atau membatasi jumlahnya. Dengan adanya resistensi, bakteri dapat menghindari atau tidak terbunuh dan dapat terus berkembang biak. Dengan adanya resistensi bakteri, infeksi akan lebih sulit diobati dan meningkatkan resiko penyebaran penyakit, memperparah penyakit, bahkan tidak mungkin diobati atau bahkan berakhir dengan kematian. Dalam banyak kasus, infeksi dengan bakteri yang resisten terhadap antibiotik memerlukan rawat inap yang lebih lama, kunjungan dokter berkepanjangan, tindak lanjut tambahan, dan alternatif yang mahal dan meningkatkan toksisitas terhadap host (WHO and ECDC Report, 2022).

Genus *Pseudomonas* merupakan bakteri yang banyak ditemukan di lingkungan, terutama pada tanah dan air. Dari banyak genus bakteri ini, *Pseudomonas aeruginosa* (selanjutnya disebut *P. aeruginosa*) merupakan salah satu bakteri yang paling banyak menyebabkan infeksi pada manusia seperti infeksi pada darah, paru-paru (pneumonia) dan bagian tubuh lain yang berhubungan dengan tindakan operasi. *P. aeruginosa* terus menemukan cara baru untuk menghindari efek antibiotik yang digunakan untuk membunuhnya. Jika resistensi pada akhirnya terjadi pada beberapa jenis antibiotik maka keadaan ini disebut sebagai *multi-drug resistance (MDR)* (CDC, 2018; CDC, 2019b).

Pseudomonas aeruginosa termasuk salah satu bakteri yang termasuk dalam kelompok ESKAPE yang merupakan singkatan *Enterobacter faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter sp.*, karena memiliki kemampuan menghindari (*escape*) target antibiotik. Spesies ini menurut WHO termasuk dalam daftar prioritas nomor satu dalam penelitian dan pengembangan antibiotik baru yang dibutuhkan segera (Botelho et al., 2019). Lebih lanjut menurut laporan *International Nosocomial Infection Control Consortium* yang dibandingkan dengan studi surveilans dari Januari 2010 – Desember 2015 pada 703 ICU diseluruh

dunia, menyatakan bahwa infeksi yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* telah menjadi perhatian khusus karena bakteri ini memiliki resistensi yang tinggi terhadap antibiotik. Secara epidemiologi ECDC pada tahun 2016 melaporkan bahwa pada *Hospital Acquired Pneumonia (HAI)* yang didapat di *Intensive Care Unit (ICU)* dan data dari 15 negara uni eropa, bahwa *P. aeruginosa* merupakan mikroorganisme yang paling sering diisolasi dari pasien pneumonia yang di dapat di ICU, diantara semua angka kejadian ISK yang di dapat di ICU, dan infeksi aliran darah yang di dapat di ICU (ECDC, 2019).

Beberapa tahun terakhir telah terjadi peningkatan prevalensi *Multi Drugs Resistant (MDR)* dan *Extensively Drug Resistant Bacteria (XDR)* dari strain *P. aeruginosa*, dengan angka kejadian antara 15% sampai 30% di beberapa wilayah geografis (Pena et al., 2015; Sader et al., 2018; Walkty et al., 2016). Pada tahun 2018, Laboratorium Resistensi Antibiotik CDC menemukan wabah *P. aeruginosa* yang resisten terhadap karbapenem dengan bentuk resistensi yang tidak biasa, yaitu 2-3% dari *P. aeruginosa* membawa elemen genetik bergerak yang mengkode pembentukan enzim karbapenemase. Enzim ini membuat antibiotik golongan karbapenem menjadi tidak efektif (CDC, 2019a).

Angka resistensi antibiotik dari *P. aeruginosa* terhadap karbapenem (misalnya meropenem, doripenem, dan imipenem) dan kuinolon cenderung meningkat dari tahun ke tahun (Karam et al., 2016). Laporan lain dari India menyebutkan bahwa resistensi *P. aeruginosa* yang diisolasi dari berbagai spesimen klinis terhadap antibiotik karbapenem adalah 10,46% (Banjare & Barapatre, 2015). Pada tahun 2011 didapatkan data bahwa angka resistensi *P. aeruginosa* yang diisolasi dari ruang ICU Rumah Sakit Umum Pusat Nasional (RSUPN) Cipto Mangunkusumo terhadap karbapenem (meropenem, doripenem) adalah 21,9% (Karuniawati et al., 2013).

Dalam beberapa penelitian telah disebutkan bahwa *P. aeruginosa* dapat menjadi resisten terhadap antibiotik karena beberapa hal seperti karena lingkungan dengan stress yang tinggi, karena pemberian antibiotik yang berkepanjangan yang disebut sebagai 'tekanan selektif' sehingga menjadi resisten terhadap antibiotik tertentu (resistensi yang didapat), dan juga bisa terjadi karena adaptasi bakteri tersebut dengan cara mengambil mekanisme resistensi bakteri lain atau bermutasi agar dapat menghindari target antibiotik yang disebut sebagai resistensi adaptif (Karampatakis et al., 2018; Langendonk et al., 2021; WHO, 2017). Jika mengacu pada *The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*

M100, *P. aeruginosa* sendiri telah memiliki resistensi intrinsik terhadap beberapa antibiotik yang memiliki cincin β -lactam seperti pada golongan penisilin (seperti ampisilin dan amoksisilin), golongan sefalosporin (seperti sefotaksim dan ceftriaxone), karbapenem (ertapenem), golongan tetrasiklin, golongan sulfonamida (trimetoprim-sulfametoksazol) dan kloramfenikol (James L. S II., 2022).

Karbapenem merupakan kelas antibiotik yang dikembangkan untuk mengobati bakteri yang resisten terhadap antibiotik golongan lain. Namun karena penggunaan antibiotik ini secara berlebihan, *P. aeruginosa* berkembang menjadi turunan (*strain*) yang resisten terhadap antibiotik golongan ini, dan disebut sebagai *carbapenem-resistant P. aeruginosa (CRPA)*. Karbapenem sampai saat ini masih dianggap para klinisi sebagai agen antibakteri yang efektif dalam menangani kasus-kasus infeksi bakteri *multidrug-resistant*, termasuk didalamnya yang disebabkan oleh infeksi *P. aeruginosa* (VDH, 2018; CDC, 2019a). Pada sebuah laporan kasus tahun 2020 melaporkan bahwa resistensi bakteri ini terhadap golongan karbapenem, belum tentu akan resisten juga terhadap golongan antimikroba yang memiliki cincin β -laktam lainnya, seperti golongan sefalosporin (Campana et al., 2017; Gajdács, 2020; Meng et al., 2023).

Salah satu mekanisme penghindaran *P. aeruginosa* terhadap antimikroba golongan karbapenem yang masih jarang diteliti di Indonesia adalah kemampuan bakteri ini dalam menurunkan ekspresi transkripsi gen *oprD* dan/atau hilangnya fungsi dengan bermutasi, yang akhirnya mengganggu aktivitas protein OprD pada protein membran permukaan selnya (*outer membran protein, OMP*) (Terzi et al., 2015). Terdapat beberapa porin dan gen pengkode pembentukannya pada OMP dari *P. aeruginosa*, semisal porin OprH (gen pengkode *oprH*) berhubungan dengan resistensi terhadap tetrasiklin, porin OprF (gen pengkode *oprF*) berhubungan dengan pembentukan biofilm, serta porin OprO dan porin OprP (gen pengkode *oprO* dan *oprP*) yang merupakan porin spesifik terhadap polifosfat (Langendonk et al., 2021; Terzi et al., 2015)

Selain sejumlah porin yang telah disebutkan diatas *P. aeruginosa* juga memiliki porin OprD (atau protein OprD) yang memiliki gen pengkode *oprD* bersifat spesifik untuk antimikroba golongan karbapenem, terutama imipenem dan meropenem, untuk berdifusi kedalam ruang periplasmik bakteri ini. Protein OprD pada bakteri ini terlibat pada mekanisme pengangkutan asam amino kationik, peptida, dan antimikroba. Resistensi yang diperantarai oleh porin OprD terjadi

sebagai akibat dari penurunan ekspresi transkripsi oprD dan/atau hilangnya fungsi akibat mutasi yang kemudian mengganggu aktivitas protein porin ini (Terzi et al., 2015).

Porin OprD sendiri bersifat selektif untuk difusi asam amino, partikel peptida, dan partikel hidrofilik dari beberapa jenis antibiotik golongan karbapenem terutama imipenem dan meropenem yang telah luas dan paling banyak digunakan oleh hampir seluruh rumah sakit di seluruh dunia (Jurado-Martín et al., 2021; Langendonk et al., 2021)

Rumusan Masalah

Gen oprD merupakan pengkode spesifik yang bertanggung jawab dalam pengaturan pengurangan ekspresi protein OprD yang berhubungan dengan difusi golongan karbapenem ke dalam periplasma *P. aeruginosa*. Dengan adanya mekanisme ini *P. aeruginosa* akan lebih kebal terhadap target kerja golongan karbapenem, disamping sederet mekanisme resistensi lain yang telah diketahui bekerja sangat efektif dalam penghindaran kerja antimikroba seperti pompa efflux, *lypopolysaccharide (LPS)*, dan lipoprotein. Karena gen oprD pada *P. aeruginosa* adalah gen pengkode untuk mengatur porin OprD, dan protein OprD sendiri bersifat spesifik terhadap antibiotik golongan karbapenem, maka belum tentu golongan antibiotik lain seperti sefalosporin atau floroquinolon akan turut menjadi resisten pada bakteri ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adakah penghilangan (*deletion*) porin OprD pada *OMP P. aeruginosa*, yang telah diketahui merupakan salah satu jalur terjadinya resistensi terhadap golongan karbapenem, melalui deteksi secara molekular tingkat ekspresi dari oprD, pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.

Pertanyaan Penelitian

1. Berapa proporsi gen pengkode oprD pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya?
2. Berapa proporsi gen pengkode karbapenemase pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya?

Tujuan Penelitian

1.1.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui proporsi gen pengkode oprD dan gen karbapenemase pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.

1.1.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui proporsi gen pengkode oprD pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.
2. Untuk mengetahui proporsi gen pengkode karbapenemase pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.

Manfaat Penelitian

1.1.3 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang infeksi *P. aeruginosa* di wilayah Makassar.

1.1.4 Manfaat Untuk Instansi Kesehatan

1. Pemeriksaan molekuler seperti yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu PCR dapat digunakan untuk mendeteksi adanya gen pengkode spesifik tertentu pada *P. aeruginosa* untuk melakukan penghindaran terhadap antibiotik.
2. Dapat memberikan informasi genetik pada isolat klinis *P. aeruginosa* dari Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.

3. Data penelitian dapat digunakan sebagai acuan dalam studi epidemiologi, sehingga dapat mengontrol dan menurunkan angka kejadian resistensi antibiotik oleh bakteri *P. aeruginosa* terutama pada rumah sakit di wilayah Makassar.
4. Penelitian ini diharapkan nantinya menjadi salah satu acuan para klinisi untuk bijak dalam pemberian antibiotik terutama golongan karbapenem pada pasien, sehingga dalam jangka panjang dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas.

1.1.5 Manfaat Untuk Peneliti

1. Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan peneliti di dalam menggunakan metode biomolekuler seperti penggunaan mesin PCR.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang kemampuan bakteri *P. aeruginosa* dalam penghindaran antibiotik golongan karbapenem melalui penurunan ekspresi porin OprD.

1.1.6 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah mendeteksi keberadaan gen pengkode karbapenemase dan gen pengkode oprD dalam merubah atau menghilangkan porin OprD yang merupakan salah satu cara untuk menghindari antibiotik golongan karbapenem disamping mekanisme lainnya pada isolat klinis *P. aeruginosa* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.

Kebaruan Penelitian

Penelitian tentang porin OprD terkait dengan resistensi karbapenem pada *P. aeruginosa* di Indonesia secara spesifik masih jarang dilakukan, kebanyakan penelitian ditujukan untuk menilai resistensi secara enzimatik pada bakteri ini, oleh sebab itu melalui penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data untuk melihat seberapa besar proporsi gen pengkode karbapenemase dan berapa besar proporsi gen oprD secara khusus di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar dan rumah sakit jejaringnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Carle Gessard, adalah orang yang pertama kali menggambarkan *P. aeruginosa* pada studinya tentang “*On the blue and green coloration of bandages*” pada tahun 1882 yang menggambarkan pyocyanin, senyawa fenazin biru-kehijauan (cyan) yang memiliki sifat antimikroba dan toksin. Nama *Pseudomonas* sendiri berasal dari dua kata Yunani: Pseudo yang berarti 'salah' dan monas yang berarti 'satu kesatuan', sedangkan *aeruginosa* berasal dari bahasa Latin yang berarti 'tembaga berkarat' yang berwarna biru kehijauan (Diggle & Whiteley, 2020).

P. aeruginosa merupakan bakteri yang tersebar luas di alam yang merupakan patogen oportunistik pada manusia. *Reservoir* bakteri ini terdapat pada tanaman, tanah, dan air ledeng (Tille, 2018; York et al., 2019). Umumnya terdapat di lingkungan yang lembab pada lingkungan rumah sakit (seperti alat bantu pernafasan dan kateter), kolam renang, shower dan pipa saluran air. *P. aeruginosa* dapat berkolonisasi di berbagai tempat pada tubuh manusia, seperti selaput lendir, saluran pernafasan, ketiak, perineum dan saluran pencernaan, walaupun bakteri ini sebenarnya bukan merupakan bagian dari mikrobiota tubuh manusia (Bavasheh & Karmostaji, 2017; York et al., 2019).

P. aeruginosa adalah salah satu spesies yang paling sering diisolasi dalam spesimen klinis, merupakan bagian yang tidak umum pada flora normal, diisolasi kurang dari 12% spesimen tinja normal. Pada orang sehat dapat menyebabkan penyakit ringan, namun menyebabkan infeksi parah pada orang dengan sistem kekebalan yang menurun. *P. aeruginosa* menyebabkan 5% sampai 15% dari semua infeksi nosokomial (*hospital-acquired infections, HAIs*), terutama pneumonia dan bakteremia (York et al., 2019).

2.1.1 Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa termasuk dalam kingdom Monera, filum Proteobacteria, kelas gamma proteobacteria, ordo Pseudomonadales, genus *Pseudomonas*, dan species *Pseudomonas aeruginosa*.

Bakteri ini adalah bakteri heterotrop, berbentuk batang Gram-negatif dengan panjang sekitar 1-5 μm dan lebar 0,5-1,0 μm dan motil. *P. aeruginosa* merupakan fakultatif anerob yang tumbuh melalui respirasi aerobik dan respirasi anaerob dengan nitrat sebagai akseptor elektron terminal. *P. aeruginosa* juga dapat tumbuh secara aerobik dengan arginin dan memiliki kemampuan fermentatif terbatas yang umumnya mendukung pertumbuhan yang sangat lambat atau tidak sama sekali. *P. aeruginosa* tumbuh dengan baik pada suhu 37°C, tetapi dapat bertahan hidup dalam rentang suhu yang luas mulai dari 5-42°C (Diggle & Whiteley, 2020)

2.1.2 Karakteristik *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan bakteri gram negatif aerobik yang tidak memfermentasi glukosa, berbentuk batang dan sering menyebabkan penyakit pada tanaman dan manusia (Rossolini & Mantengoli, 2008; York et al., 2019).

Bakteri ini menghasilkan koloni dengan bau khas seperti anggur atau tortilla segar pada media, beberapa strain dapat menunjukkan hemolisis pada agar darah (BAP), pada agar MacConkey koloni tampak bening karena tidak memfermentasi laktosa, dan positif pada tes oksidase dan katalase. Tes konfirmasi termasuk produksi pigmen biru-hijau pyocyanin pada terutama pada agar ceftrimide dan pertumbuhan pada suhu 42°C (CDC, 2020; York et al., 2019)

P. aeruginosa sendiri membentuk koloni bulat halus pada media padat in vitro dengan warna fluoresen kehijauan. Banyak strain *P. aeruginosa* menghasilkan pigmen kebiruan non-fluoresen, pyocyanin, yang berdifusi ke dalam agar. *P. aeruginosa* juga menghasilkan pyoverdine pigmen fluoresen, yang memberikan warna kehijauan pada agar-agar bila dikombinasikan dengan pyocyanin, beberapa strain juga dapat menghasilkan pigmen merah tua (pyorubin) atau pigmen hitam kecoklatan (pyomelanin). *P. aeruginosa* dalam kultur dapat menghasilkan banyak jenis koloni, dan isolat dari jenis koloni yang berbeda mungkin juga memiliki aktivitas biokimia dan enzim yang berbeda dan pola resistensi antimikroba yang berbeda. Kadang-kadang, mungkin tidak jelas apakah jenis koloni mewakili strain *P. aeruginosa* yang berbeda atau merupakan varian dari strain yang sama. Kultur dari pasien dengan *cystic fibrosis* (CF) sering menghasilkan organisme *P. aeruginosa* yang membentuk koloni mukoid sebagai akibat dari kelebihan produksi alginat, suatu eksopolisakarida yang tampaknya merupakan matriks bagi organisme untuk hidup dalam biofilm (York et al., 2019).

2.1.3 Faktor Viruensi *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa memproduksi eksotoksin A yang merupakan faktor yang berkontribusi terhadap patogenisitas organisme ini, yaitu membunuh sel inang dengan menghambat sintesis protein. Disisi lain eksoenzim S dan T yang dapat mengganggu sitoskeleton, juga produksi beberapa enzim proteolitik (misalnya, elastase) dan hemolisin (misalnya, fosfolipase C) yang mampu menghancurkan sel dan jaringan (Mahon et al., 2019).

Pada permukaan sel *P. aeruginosa*, pili dan adhesin memediasi dan memperkuat perlekatan pada sel inang, juga menghasilkan alginat, yaitu polimer polisakarida yang dapat menghambat fagositosis, melindungi bakteri dari dehidrasi dan aktivitas antibiotik yang berkontribusi terhadap potensi infeksi pada pasien CF. Pyocyanin yang merupakan pigmen phenazine yang berwarna biru kehijauan yang khas pada *P. aeruginosa*, dapat merusak sel dengan memproduksi spesies oksigen reaktif. Spesies oksigen reaktif juga bersifat bakterisida bagi organisme, dan untuk melindungi dirinya sendiri organisme menghasilkan enzim katalase untuk mencegah kehancurannya (Mahon et al., 2019; York et al., 2019)

Faktor Virulensi lain *P. aeruginosa* yang juga mendukung patogenisitasnya seperti endotoksin (*lipopolysaccharide*, LPS), motilitas, kapsul, flagela, fosfolipase, sistem sekresi tipe III, dan beberapa eksotoksin protease, hemolisin, lesitinase, dan deoksiribonuklease (DNase). *P. aeruginosa* juga secara inheren resisten terhadap sejumlah agen antimikroba (Mahon et al., 2019) Beberapa penelitian terakhir juga menemukan beberapa komponen faktor virulensi lain (Gambar 2.1) seperti mekanisme porin dan pompa efflux pada mekanisme resistensi antimikroba, sistem sekresi lain, *quorum sensing*, pili, dan pembentukan biofilm pada bakteri ini (Jurado-Martín et al., 2021).

Tabel dibawah ini merangkum faktor virulensi dari *P. aeruginosa* yang telah diketahui fungsinya sampai saat ini:

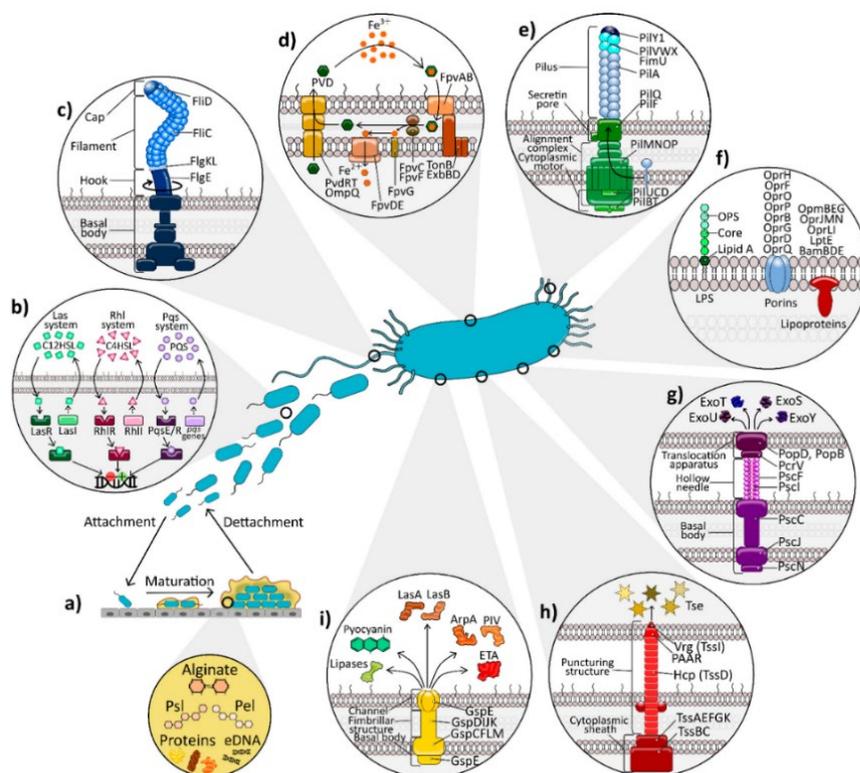
Tabel 2.1 Faktor virulensi *Pseudomonas aeruginosa* (Jurado-Martín et al., 2021)

Faktor Virulensi	Fungsi
Membran luar	
Lipopolisakarida	merupakan penghalang fisik, memediasi interaksi dengan reseptor host, dan menstimulasi <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>

Faktor Virulensi		Fungsi
Protein membran luar	OprF	memelihara integritas sel, mengikat peptidoglikan, saluran difusi (toluena, siderophores, nitrat, nitrit), adhesi (sel epitel alveolar dan bakteri lainnya), regulasi faktor virulensi lainnya, sensor sistem kekebalan tubuh
	OprH	pengikatan protein (SP-A dan laminin), resistensi aminoglikosida dan polimiksin, transportasi (molekul hidrofobik, asam amino, zat besi, dan kation)
	OprD	pengikatan laminin, resistensi terhadap karbapenem, transportasi molekul (asam amino, peptida, glukonat)
	OprG	pengikatan laminin
	OprQ	pengikatan fibronektin, adhesi (sel epitel)
	OprL	memelihara integritas sel, perlindungan terhadap stres oksidatif
	OprI	memelihara integritas sel
	BamBDE	biogenesis membran luar
	LptE	biogenesis membran luar
	OprJMN	resistensi antibiotik, aktivitas efflux pump
OpmBEG	resistensi antibiotik, aktivitas efflux pump	
Lipoprotein		mesin perakitan yang digunakan untuk biogenesis membran luar
Pembentukan biofilm		
Alginate		disebut juga <i>mucoïd exopolysaccharide (MEP)</i> , EPS yang merupakan komponen utama biofilm mucoid, menempel pada musin, berfungsi sebagai adhesin alternatif, melindungi dari fagositosis inang
Pergerakan dan perlekatan		
Flagel		monopolar, digunakan untuk motilitas, memediasi adhesi pada musin
Pili		struktur penting untuk inisiasi infeksi dengan memediasi motilitas dan adhesi
Sistem sekresi protein		
Sistem sekresi tipe III (T3SS)		menyuntikkan efektor toksik langsung ke sitosol sel inang
Produk yang dilepaskan		
Exotoxin A		paling beracun, ADP-ribosyl transferase yang disekresikan melalui T2SS, menyebabkan nekrosis ireversibel di lokasi kolonisasi dengan menghambat sintesis protein sel inang
Enzim proteolitik	Elastase (LasA, staphylolysin)	menyebabkan lisis cepat <i>Staphylococcus aureus</i> , bersama LasB membelah ikatan glisin-glisin dalam elastin, berkorelasi dengan resistensi antibiotik, sekresi melalui T2SS

Faktor Virulensi		Fungsi
	Elastase (LasB, pseudolysin/ elastase)	faktor virulensi ekstraseluler utama, elastinolitik yang menurunkan elastin host dengan mengganggu sambungan erat epitel dan membelah protein inang lainnya (bergantung pada zinc / metalloprotease), sekresi melalui T2SS
	Alkaline protease (aeruginolysin)	merusak endotelium, menurunkan produksi sitokin, dan penghindaran fagositosis, sekresi melalui T1SS
Enzim lipolitik	Lipase (LipA)	membelah lipid, menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol
	Esterase EstA	menghidrolisis ester gliserol dengan asam lemak dan diangkut melalui T5SS, berperan pada motilitas sel, dan pembentukan biofilm
	Fosfolipase C	memecah fosfolipid membran dan sphingomyelin eukariotik, memiliki aktivitas hemolitik
Pyocyanin		metabolit sekunder redoks aktif yang memberi warna biru-kehijauan pada koloni <i>P. aeruginosa</i> dalam kultur; memprovokasi stres oksidatif dan merusak komponen siklus sel, beberapa enzim, dan DNA, yang mengarah ke lisis sel, disekresikan oleh T2SS
Produk lain bakteri		
Rhamnolipid (RL)		mengurangi surfaktan paru-paru, mengurangi hambatan listrik transepitel, dan mengganggu ikatan antara epitel pernapasan, berhubungan erat dengan <i>ventilator associated pneumonia</i> (VAP)
Enzim antioksidan (katalase)		membantunya mengatasi stres oksidatif pada inang, detoksifikasi dalam kondisi anaerob
Sistem akuisisi zat besi (Fe ³⁺)		memenuhi kebutuhan zat besi dengan produksi senyawa organik siderophores (pyoverdine dan pyochelin), menyerap xenosiderophores, menyerap haeme dari hemato protein inang
Quorum sensing (QS)	Acyl-Homoserine Lactone QS Systems (Las dan Rhl)	mempengaruhi pembentukan T6SS, menginduksi apoptosis sel epitel dan menurunkan ikatan antar epitel
	The Quinolone QS System (Pqs)	mengatur ekspresi gen yang terkait dengan kekurangan besi, pompa efflux pada resistensi antibiotik, dan biosintesis hidrogen sianida, RL, elastase, dan kitinase ekstraseluler; juga memediasi pelepasan eDNA yang penting untuk pembuatan biofilm yang stabil dan matang
	The Novel QS System (Iqs)	memantau kepadatan bakteri, mendeteksi keterbatasan fosfat, stress selama infeksi, untuk mengatur produksi faktor virulensinya yang akhirnya menghambat pertumbuhan sel inang dan merangsang apoptosis, menghalangi perbaikan kerusakan DNA inang

Seperti yang telah di jelaskan dalam bab 1, secara alamiah bakteri ini memiliki resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik, sehingga infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini sulit untuk diobati dan dapat mengancam jiwa, terutama pada strain yang multiresisten (MDR) terhadap antibiotik (CDC, 2019).



Gambar 2.1 Skema dari faktor virulensi utama yang digunakan oleh *Pseudomonas aeruginosa*.

Sumber: Jurado-Martín et al., 2021.

Prevalensi infeksi *P. aeruginosa* yang MDR telah banyak dijelaskan dalam berbagai literatur, termasuk resisten terhadap antibiotik golongan β -lactam spektrum luas, hal ini membuat pemilihan antibiotik yang sesuai menjadi sangat sulit yang secara tidak langsung meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi di seluruh dunia. Infeksi nosokomial akibat *P. aeruginosa* telah dilaporkan pada luka bedah, juga menyebabkan infeksi luka post operasi. Selain itu, *P. aeruginosa* dapat menyebar dari tempat infeksi awal dan masuk ke aliran darah, menyebabkan sepsis (WHO and ECDC, 2022).

Selain itu, MDR telah menjadi masalah utama dalam pengelolaan infeksi nosokomial *P. aeruginosa* karena akuisisi β -laktamase kromosomal, β -laktamase

spektrum luas, karbapenemase, mutasi porin, dan pompa efluks. Persentase isolat *P. aeruginosa* yang resisten terhadap berbagai obat sangat bervariasi (<1% hingga >50%) menurut wilayah dan negara. (York et al., 2019)

Antibiotik yang diketahui efektif dalam menekan infeksi akibat bakteri ini adalah karbapenem, piperacillin, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, amikacin dan tobramycin (Bavasheh & Karmostaji, 2017).

2.1.4 Pengambilan sampel *Pseudomonas aeruginosa*

Tidak ada pertimbangan khusus yang diperlukan untuk pengumpulan, transport dan pemrosesan sampel *P. aeruginosa* (Mahon & Lehman, 2019). Spesimen bisa diperoleh dari lesi kulit, pus, urin, darah, LCS, dahak, dan bahan lain harus diperoleh sesuai dengan indikasi jenis infeksi (York et al., 2019)

2.1.5 Genetik *Pseudomonas aeruginosa*

Terdapat 5021 gen dan lebih dari 70% identitas urutan berbeda diantara strain *Pseudomonas aeruginosa*, dan di antara spesies ini, sekitar 4500 gen dengan identitas > 98%. Terdapat sekitar 4000 gen umum untuk sebagian besar strain *P. aeruginosa* yang telah diketahui dan disebut sebagai genom inti (Parkins et al., 2018). Strain inti *P. aeruginosa* sendiri memiliki set lengkap gen yang ditemukan diantara strain *P. aeruginosa* berbeda yang terdiri dari 10.000 dan 40.000 gen. Susunan genom mungkin berbeda antara strain, sehingga identifikasi daerah yang cocok untuk penanda gen cukup sulit (Spilker et al., 2004). Secara genomik ukuran *P. aeruginosa* adalah sekitar sekitar 6,5 Mbp. Namun, kisaran ukuran untuk strain yang berbeda adalah antara 5,2 sampai 7 Mbp (Schmidt et al., 1996).

Sampai saat ini untuk memfasilitasi identifikasi sampai tingkat spesies, telah banyak digunakan data urutan RNA ribosom (rRNA) 16S *P. aeruginosa* untuk melakukan uji PCR yang dimaksudkan untuk memberikan identifikasi tingkat genus bahkan spesies. Metode identifikasi berbasis molekuler lebih banyak digunakan untuk menghindari masalah fenotipe yang berbeda-beda, dan juga dapat memberikan identifikasi sampai tingkat spesies yang lebih akurat. Dengan adanya data tentang 16S rRNA yang semakin lengkap saat ini, diharapkan dapat dilakukan pemeriksaan PCR yang sederhana, cepat, dan akurat yang memungkinkan diferensiasi *P. aeruginosa* dari spesies *Pseudomonas* lainnya (Karpati & Jonasson, 1996).

Karpati dan Jonasson telah menggunakan metode deteksi 16S rRNA dalam sebuah penelitian mereka pada pasien *cystic fibrosis* (CF) yang dilakukan untuk membedakan *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* dan *Burkholderia cepacia*, mereka menggunakan primer 16S rRNA dengan primer spesifik *Pseudomonas* dalam uji PCR untuk mendeteksi DNA *Pseudomonas*, cara ini dianggap cukup memberikan informasi sampai tingkat genus, namun dalam penelitian ini tidak diatur untuk membedakan *P. aeruginosa* dari spesies *Pseudomonas* lainnya (Karpati & Jonasson, 1996; Spilker et al., 2004).

Urutan 16S rRNA telah lama digunakan sebagai standar baku dalam taksonomi untuk menentukan filogeni spesies bakteri tertentu. Amplifikasi selektif *Pseudomonas* 16S rRNA dengan PCR diikuti dengan analisis gel elektroforesis telah digunakan untuk mendeteksi dan membedakan spesies *Pseudomonas* dari sampel klinis bahkan spesies dari lingkungan (Duineveld et al., 2001; Widmer et al., 1998).

Metode PCR lain yang juga masih dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *P. aeruginosa* dalam sampel klinis adalah dengan mendeteksi OprI (sampai tingkat genus), dan untuk sampai tingkat spesies dengan mendeteksi OprL *P. aeruginosa* (Gholami et al., 2016)

Cara lainnya untuk membedakan *P. aeruginosa* dengan cepat dan cukup akurat dari genus *Pseudomonas* lain adalah metode PCR yang menargetkan gen pengkode exotoxin A (gen *toxA*) dari sampel klinis, sedangkan untuk uji konfirmasi didapat dari gambaran fenotipik khas pada media pertumbuhan seperti Blood Agar (BAP), MacConkey Agar (MAC) dan Muller Hinton Agar (MHA) dan beberapa tes standar seperti tes oxidase dan katalase (York et al., 2019).

2.1.6 Patogenesis pada Infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Terdapat beberapa proses yang cukup sering dibahas dalam proses terjadinya penyakit pada infeksi pada manusia yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* karena faktor virulensinya, antara lain:

a. Toksin

P. aeruginosa menggunakan faktor virulensi eksotoksin A untuk menonaktifkan faktor perpanjangan eukariotik 2 (faktor penting untuk sintesis protein pada eukariotik) melalui ADP-ribosilasi dalam sel inang, seperti halnya toksin difteri yang berakibat tidak dapat mensintesis protein. *P. aeruginosa*

juga dapat menggunakan eksoenzim yaitu ExoU, yang merusak membran plasma sel eukariotik sehingga terjadi lisis sel (Kirienko et al., 2013).

b. Fenazin

Fenazin adalah pigmen aktif redoks yang diproduksi oleh *P. aeruginosa*, dan terlibat dalam *quorum sensing*, virulensi, dan perolehan zat besi. Enzim yang dikodekan oleh operon ini mengubah asam chorismic menjadi fenazine-1-karboksamida (*PCA*). Produk dari tiga gen kunci, *phzH*, *phzM*, dan *phzS* kemudian mengubah *PCA* menjadi fenazin lain. Jika pyocyanin dihambat, akan terjadi penurunan patogenisitas *P. aeruginosa*, hal ini dianggap paling bertanggung jawab atas kolonisasi awal *P. aeruginosa* pada tubuh (Mavrodi et al., 2001)

c. Quorum sensing

(Dekimpe & Déziel, 2009)(Dekimpe & Déziel, 2009)*P. aeruginosa* adalah patogen oportunistik dengan kemampuan untuk mengkoordinasikan ekspresi gen untuk bersaing dengan spesies lain untuk mendapatkan nutrisi atau kolonisasi. Pengaturan ekspresi gen dapat terjadi melalui komunikasi sel-sel atau disebut *quorum sensing* (QS) melalui produksi molekul kecil yang disebut *autoinducer* yang dilepaskan ke lingkungan eksternal. Sinyal-sinyal ini, ketika mencapai konsentrasi spesifik berkorelasi dengan kepadatan sel populasi tertentu, mengaktifkan regulator masing-masing sehingga mengubah ekspresi gen dan perilaku koordinasi. *P. aeruginosa* menggunakan lima sistem QS yang saling berhubungan yaitu *las*, *rhl*, *pqs*, *iqs* dan *pch* yang masing-masing menghasilkan molekul pensinyalan yang unik. Sistem LAS dan RHL bertanggung jawab atas aktivasi berbagai gen yang dikendalikan QS, sistem PQS terlibat dalam pensinyalan kuinolon dan sistem IQ memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel (Allesen-Holm et al., 2006). Diketahui bahwa sebagian sistem RHL mengontrol faktor-faktor spesifik *las*, seperti enzim proteolitik yang bertanggung jawab untuk kegiatan elastolitik dan stafilolitik, tetapi dengan cara lambat. Jadi *las* adalah pengatur langsung dan tidak langsung dari gen yang dikendalikan QS (Dekimpe & Déziel, 2009).

d. Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm *P. aeruginosa* diatur oleh satu molekul tunggal yaitu siklik di-GMP (*cyclic di-Guanosine Monophosphate*). Pada saat konsentrasi siklik di-GMP rendah, *P. aeruginosa* dapat berenang bebas, tetapi ketika

tingkat siklik di-GMP meningkat, *P. aeruginosa* mulai membangun koloni di permukaan. Konsentrasi intraseluler di-GMP siklik meningkat dalam hitungan detik ketika *P. aeruginosa* menyentuh permukaan seperti plastik atau jaringan inang. Hal ini kemudian akan mengaktifkan produksi pili untuk menstabilkan perlekatan *P. aeruginosa* pada permukaan. Pada tahap selanjutnya, bakteri akan mulai menempel dan menghasilkan matriks yang sangat lengket disebut sebagai biofilm, hal ini juga akan menekan siklik di-GMP untuk menekan sintesis flagel untuk mencegah *P. aeruginosa* bergerak menggunakan flagelnya. Matriks biofilm *P. aeruginosa* terdiri dari asam nukleat, asam amino, karbohidrat, dan berbagai ion. Biofilm sendiri merupakan usaha mekanis dan kimiawi untuk melindungi *P. aeruginosa* dari agresi oleh sistem kekebalan tubuh inang dan beberapa senyawa beracun lainnya (Laventie et al., 2019).

2.1.7 Gambaran Klinis Pada Infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan penyebab utama infeksi saluran pernapasan pada pasien dengan perawatan lama di rumah sakit. Berbagai macam penyakit klinis telah didokumentasikan sebagai akibat infeksi *P. aeruginosa*, termasuk bakteremia (sering muncul dengan ektima gangrenosum), infeksi luka, penyakit paru terutama di antara individu dengan *cystic fibrosis (CF)*, infeksi saluran kemih nosokomial (ISK), endokarditis, infeksi tulang, infeksi mata, (seperti keratitis, abses, dan endophthalmitis), agen infeksi pada luka bakar atau trauma, folikulitis bak mandi (*jacuzzi syndrome atau hot tub syndrome*), dan dalam kasus yang jarang terjadi seperti infeksi sistem saraf pusat, termasuk meningitis (Mahon & Lehman, 2019; York et al., 2019)

Dari semua bakteri gram negatif *P. aeruginosa* menyumbang hingga 6% dari semua bakteremia dan sebanyak 75% bakteremia yang di dapat di rumah sakit, serta merupakan penyebab paling umum ketiga setelah *E. coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. Prognostik buruk terkait dengan bakteremia yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* seperti syok septik, granulositopenia, terapi antimikroba yang tidak tepat, dan adanya lesi metastatik septik. *P. aeruginosa* yang diisolasi dari bagian tubuh yang steril, seperti darah, cairan pleura, cairan sendi atau jaringan, atau cairan serebrospinal (CSF), hampir selalu merupakan infeksi yang sebenarnya (Mahon & Lehman, 2019).

Pasien yang dirawat di unit perawatan intensif (ICU) yang menggunakan ventilasi mekanis seringkali menjadi sasaran kolonisasi bakteri ini, yang

menyebabkan pneumonia terkait ventilator, terutama pada pasien dengan gangguan sistem imun atau pasien yang sakit parah. Kondisi ringan lainnya yang terkait dengan infeksi *P. aeruginosa* adalah otitis eksterna, khususnya, pada perenang atau penyelam, penyakit pada fasilitas rekreasi seperti ruam nekrotikans (disebut sebagai sindrom bak mandi air panas (*jacuzzi/hot tub syndrome*), juga infeksi pada bantalan kuku pada orang yang menggunakan kuku palsu (Mahon & Lehman, 2019).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa* Resisten Karbapenem

2.2.1 Definisi Antibiotik

Antimikroba adalah substansi kimia yang dihasilkan dari berbagai macam spesies mikroorganisme atau diproduksi secara semisintesis dan sintesis untuk menghambat (bakteriostatik) atau membunuh (bakterisidal) mikroorganisme tertentu. Antibiotik adalah agen antimikroba yang bekerja melawan infeksi bakteri yang telah digunakan sejak lama secara global dalam dunia kesehatan untuk mengobati infeksi pada manusia. Berdasarkan strukturnya antibiotik terdiri dari dua golongan yaitu β -lactam dan non β -lactam, sedangkan golongan β -lactam merupakan golongan antibiotik yang paling sering digunakan hingga saat ini (Bbosa et al., 2014; Mohr, 2016).

2.2.2 Mekanisme Resistensi Antibiotik

Mekanisme Kerja Antibiotik Secara Umum. Skema klasifikasi antibiotik yang paling umum didasarkan pada struktur molekulnya, cara kerja dan spektrum aktivitas. Hal lainnya termasuk rute pemberian seperti suntikan, oral atau topikal. Antibiotik dalam golongan yang sama umumnya akan menunjukkan pola efektivitas, toksisitas, dan alergi yang serupa, demikian juga dengan pola efek samping. Beberapa golongan yang umum antibiotik didasarkan pada struktur kimia atau molekulnya, termasuk didalamnya golongan β -laktam, makrolida, tetrasiklin, kuinolon, aminoglikosida, sulfonamid, glikopeptida dan oxazolidinones (Etebu & Ariekpar, 2016).

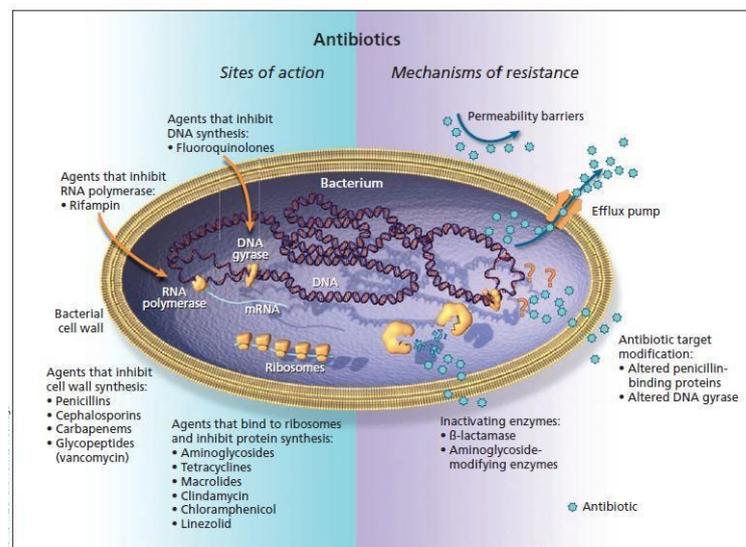
Pembagian antibiotik berdasarkan mekanisme kerja. Berdasarkan mekanisme aksinya, antibiotik dapat dibagi menjadi enam golongan besar, diantaranya adalah: (Dzidic et al., 2008; Etebu & Ariekpar, 2016)

1. Dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri, golongan antibiotik ini meliputi: penisillin, sefalosporin, vankomisin, penghambat betalaktamase, karbapenem, aztreonam, polimiksin dan basitrasin.
2. Dengan menghambat sintesis protein bakteri, golongan antibiotik ini meliputi meliputi: aminoglikosida (gentamisin), tetrasiklin, makrolida, kloramfenikol, klindamisin, linezolid dan streptogramin.
3. Dengan menghambat sintesis DNA, golongan ini seperti: fluorokuinolon dan metronidazole.
4. Dengan menghambat sintesis RNA bakteri, yaitu golongan rifamisin: rifampisin.
5. Dengan menghambat sintesis asam mikolat, seperti: isoniazid.
6. Dengan menghambat sintesis asam folat, yaitu: sulfonamid dan trimethoprim.

Seperti yang sudah dijelaskan diatas bahwa antibiotik bekerja dengan cara berinteraksi dengan target pada bagian tertentu dari bakteri, seperti menghambat sintesis dinding sel bakteri, sintesis protein atau replikasi asam nukleat (Gambar 2.2). Dengan demikian, untuk mencapai hal ini antibiotik harus memiliki akses dan mengikat ke situs target tertentu pada bakteri (Mulvey & Simor, 2009).

Resistensi antibiotik dapat bersifat intrinsik atau didapat (ekstrinsik), termasuk resistensi dengan mengkode mekanisme resistensi biokimia spesifik secara genetik seperti inaktivasi enzimatik antibiotik, perubahan struktur situs target antibiotik, dan perubahan yang mencegah akses konsentrasi yang cukup agen antibiotik sampai ke situs target (Mulvey & Simor, 2009).

Dalam dunia kesehatan organisme yang resisten terhadap antibiotik dapat masuk ke fasilitas perawatan kesehatan yaitu dengan masuknya pasien yang telah terkolonisasi oleh strain resisten tersebut. Hal lain yang juga memungkinkan adalah, resistensi antimikroba dapat muncul pada bakteri sebagai respons akibat tekanan selektif antibiotik, atau organisme resisten dapat menyebar dari orang ke orang. Kombinasi faktor-faktor ini mungkin terlibat dalam munculnya dan penularan resistensi antimikroba dalam fasilitas perawatan kesehatan (Mulvey & Simor, 2009).

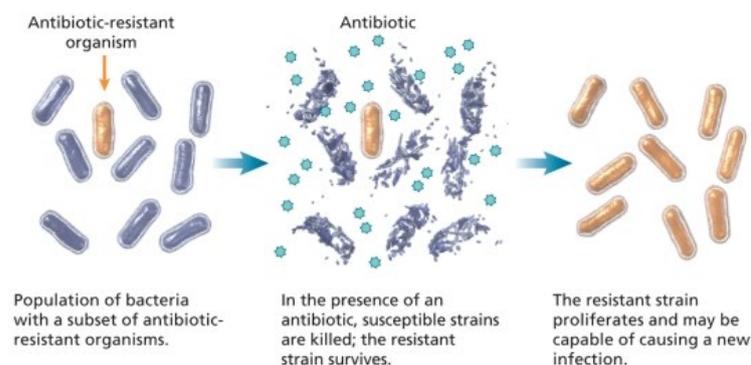


Gambar 2.2. Lokasi target antibiotik dan mekanisme potensial resistensi bakteri terhadap agen antibiotik.

Sumber: Mulvey & Simor, 2009.

a. Resistensi karena tekanan selektif antibiotik

Bakteri mungkin secara intrinsik resisten terhadap antibiotik, atau memperoleh resistensi dari bakteri lain. Bakteri dalam hal ini *P. aeruginosa*, yang terus menerus mengalami tekanan selektif antibiotik akan memicu mutasi strain organisme resisten (Gambar 2.3) yang kemudian dapat berkembang biak dan menjadi dominan (Mulvey & Simor, 2009).



Gambar 2.3 Pengaruh tekanan selektif antibiotik pada bakteri menyebabkan mutasi strain resisten.

Sumber: Mulvey & Simor, 2009.

b. Transmisi klonal organisme resisten antibiotik

Organisme yang resisten terhadap antibiotik dapat menyebar dari pasien ke pasien di fasilitas perawatan kesehatan, atau melalui tangan petugas kesehatan yang terkontaminasi, peralatan medis atau bedah yang terkontaminasi, atau lingkungan rumah sakit. Jenis penyebaran ini umumnya klonal, dan melibatkan transmisi satu strain organisme resisten antibiotik, yang lebih umum adalah resistensi antibiotik yang terjadi akibat transmisi plasmid dari satu bakteri ke bakteri lainnya (Mulvey & Simor, 2009).

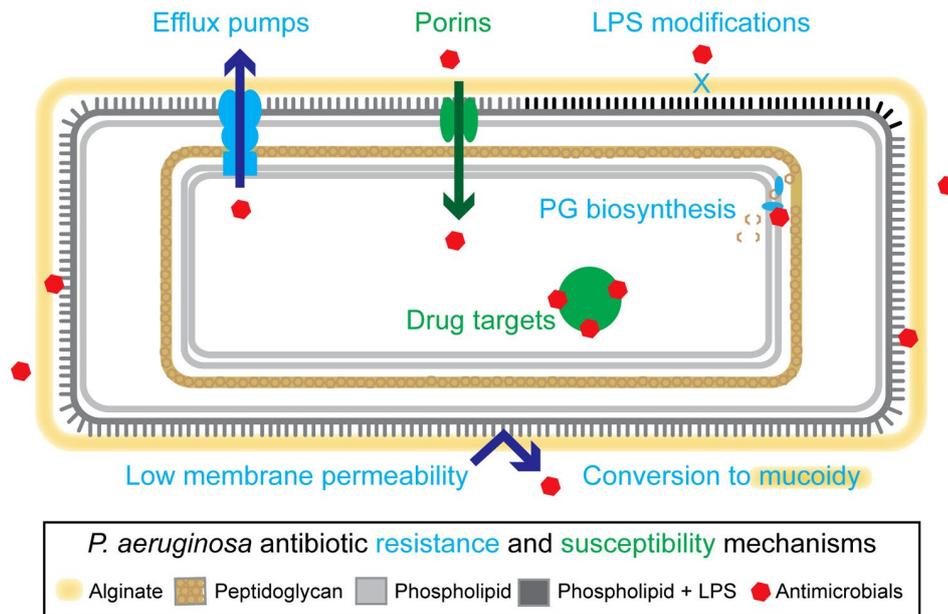
2.2.3 Mekanisme Resistensi *Pseudomonas aeruginosa* Terhadap Golongan Karbapenem

Terdapat beberapa mekanisme dasar yang dengan resistensi *P. aeruginosa*, baik secara intrinsik dan ekstrinsik (adaptif) terhadap golongan antibiotik, antara lain: (Park et al., 2014)

1. Membran yang sangat impermeabel
2. Konversi menjadi mukoid
3. Menginaktivasi antibiotik
4. Mengurangi porin membran luar
5. Modifikasi lipopolisakarida (LPS)
6. Modifikasi target antibiotik

Contoh protein spesifik yang terlibat dalam mekanisme ini meliputi MexAB-OprM (pompa efluks), OprD (porin), ArnA dan ArnB (protein pengubah LPS), GyrA (target obat, proses metabolisme DNA), dan NagZ (biogenesis dinding sel berbasis peptidoglikan) (Park et al., 2014).

Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya bahwa antibiotik golongan karbapenem bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel dari *P. aeruginosa*. Skema sederhana dari proses resistensi terhadap karbapenem dapat dilihat pada Gambar 2.4. Dalam mekanisme resistensi terhadap karbapenem hal-hal yang terlibat antara lain seperti pompa efluks, porin modifikasi LPS dan pembentukan membran mukoid pada LPS (Park et al., 2014).



Gambar 2.4 Beberapa mekanisme yang terlibat pada resistensi pada *Pseudomonas aeruginosa*.

Sumber: Park et al., 2014.

2.3 Porin OprD

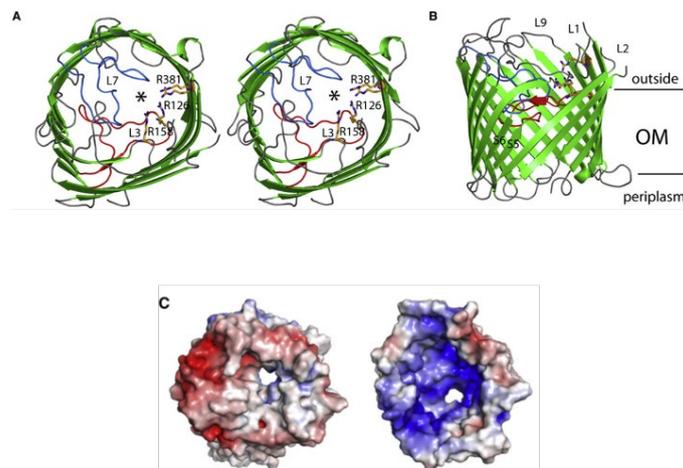
2.3.1 Definisi

Porin adalah protein berbentuk cincin melingkar berongga (laras) yang disebut sebagai β -barel beta yang melintasi membran sel dan bertindak sebagai pori, di mana molekul-molekul dapat berdifusi. Tidak seperti protein transpor membran lainnya, porin cukup besar untuk memungkinkan difusi pasif, yaitu bertindak sebagai saluran yang spesifik untuk berbagai jenis molekul (Schirmer, 1998). Porin merupakan sebuah media transport yang tidak hanya berfungsi dalam mengangkut nutrisi dan molekul lain melintasi membran, tetapi mereka juga berperan dalam pensinyalan, adhesi dan stabilitas membran. Kekurangan relatif jumlah porin dalam membran luar (OM) *P. aeruginosa* menurunkan tingkat di mana antibiotik dapat menembus sel (Langendonk et al., 2021).

OprD adalah protein spesifik porin membran luar dari *P. aeruginosa*, yang memungkinkan difusi basa asam amino dan peptida kecil ke dalam sel. Porin OprD juga merupakan saluran utama untuk masuknya antibiotik golongan karbapenem ke dalam periplasma bakteri ini (Park et al., 2014; Shen et al., 2015)

2.3.2 Struktur OprD

OprD adalah porin substrat spesifik membran luar yang terbuat dari 16 untai transmembran struktur- β yang berbentuk laras dari bagian OMP *P. aeruginosa* pada permukaan terluarnya (Gambar 2.5). Untai β transmembran saling berhubungan oleh tujuh putaran pendek pada sisi periplasma dan oleh delapan putaran daerah loop yang lebih panjang pada permukaan luar (Turk, 2011).



Gambar 2.5 Sketsa struktur OprD. (A) OprD dilihat dari sisi ekstraseluler, untai β (hijau); loop berwarna abu-abu. Lokasi pori OprD ditunjukkan dengan tanda bintang. (B) OprD Tampak samping. Perkiraan batas bagian hidrofobik dari membran luar (OM) ditunjukkan dengan garis horizontal. (C) OprD dilihat dari sisi ekstraseluler (kiri) dan dari sisi periplasma (kanan).

Sumber: Turk et al., 2011.

2.3.3 Peran OprD Pada Resistensi Karbapenem

Resistensi *P. aeruginosa* yang diperantarai oleh porin OprD terjadi sebagai akibat dari penurunan ekspresi transkripsi oprD dan/atau hilangnya fungsi akibat mutasi yang kemudian mengganggu aktivitas protein porin ini. Porin OprD merupakan tempat difusi antibiotik hidrofilik seperti golongan karbapenem ke dalam ruang periplasma, dengan terjadinya penurunan ekspresi transkripsional porin ini, maka antibiotik ini tak dapat lagi berdifusi melewati dinding sel bakteri ini (Langendonk et al., 2021; Terzi et al., 2015). Terdapat beberapa mekanisme spesifik yang mengakibatkan penurunan ekspresi pada proses transkripsi gen oprD, diantaranya (i) gangguan promotor oprD, (ii) penghentian prematur transkripsi oprD, (iii) kerjasama dengan mekanisme resistansi logam, (iv) proses reduksi yang diperantarai oleh salisilat, dan (v) penurunan ekspresi transkripsional melalui

pengaturan bersama dengan *efflux pump multidrug* yang dikodekan oleh mexEF-oprN (Langendonk et al., 2021).

Penurunan ekspresi porin OprD akan meningkatkan resisten terutama terhadap imipenem. Strain *P. aeruginosa* yang paling tahan terhadap karbapenem menunjukkan defek pada ekspresi protein OprD pada membran luarnya, dengan hilangnya OprD dapat menghadirkan mekanisme utama resistensi karbapenem pada bakteri ini (Shen et al., 2015). Dalam penelitian sebelumnya telah dilaporkan juga banyak jenis mekanisme CRPA, termasuk produksi spektrum β -laktamase atau karbapenemase, ekspresi berlebihan dari pompa efflux, dan hilangnya porin membran luar, dengan porin OprD hilang pada 94 (86,2%) dari strain dalam penelitian mereka (Fournier et al., 2013).

Zhang et al. telah melakukan penelitian terkait substrat OprD ini, dan represi gen oprD yang bergantung pada sRNA mengarah pada peningkatan resistensi terhadap golongan karbapenem (Zhang et al., 2017). Protein pada porin OprD yang spesifik terkait mekanisme resistensi terhadap golongan karbapenem adalah porin OprD₂ (Shen et al., 2015).

Disisi lain OprD tidak bekerja sendiri dalam mekanisme resistensi antibiotik terutama dalam resistensi intrinsik dan resistensi multi obat (*MDR*) dari *P. aeruginosa* melainkan memiliki korelasi erat dengan pompa efflux pada membran luar bakteri ini. Sistem pompa *P. aeruginosa*, yang disusun oleh tiga unsur penting yaitu:

1. Transporter protein membran plasma yang menggunakan energi dalam bentuk gaya type proton untuk mengangkut obat dan zat lain melalui membran dalam
2. Protein ikat periplasmik
3. Komponen protein membran luar dengan bentuk seperti laras

Dua jenis pompa effluks yang paling sering diamati pada *P. aeruginosa*, adalah MexAB-OprM (Multidrug efflux system AB-Outer membrane protein M), terdiri dari pompa MexB, lipoprotein penghubung mexA dan portal keluar OprM; dan MexXY-OprM (Shen et al., 2015).

2.3.4 Deteksi 16S rRNA *P. aeruginosa*

Ribosom pada bakteri ini seperti pada prokariotik lainnya melibatkan dua jenis subunit ribosomal yaitu subunit besar (50S) dan sub unit kecil (30S) pada proses sintesis proteinnya. 16S rRNA sendiri merupakan bagian dari subunit kecil ribosomnya yang saat ini telah banyak dipergunakan melalui deteksi molekuler

untuk menentukan *Pseudomonas* sampai tingkat substrain (Spilker et al., 2004; Widmer et al., 1998)

2.3.5 Deteksi Gen Pengkode oprD *P. aeruginosa*

Produk dari proses PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa, dan tiga kemungkinan hasil diharapkan: (Shen et al., 2015)

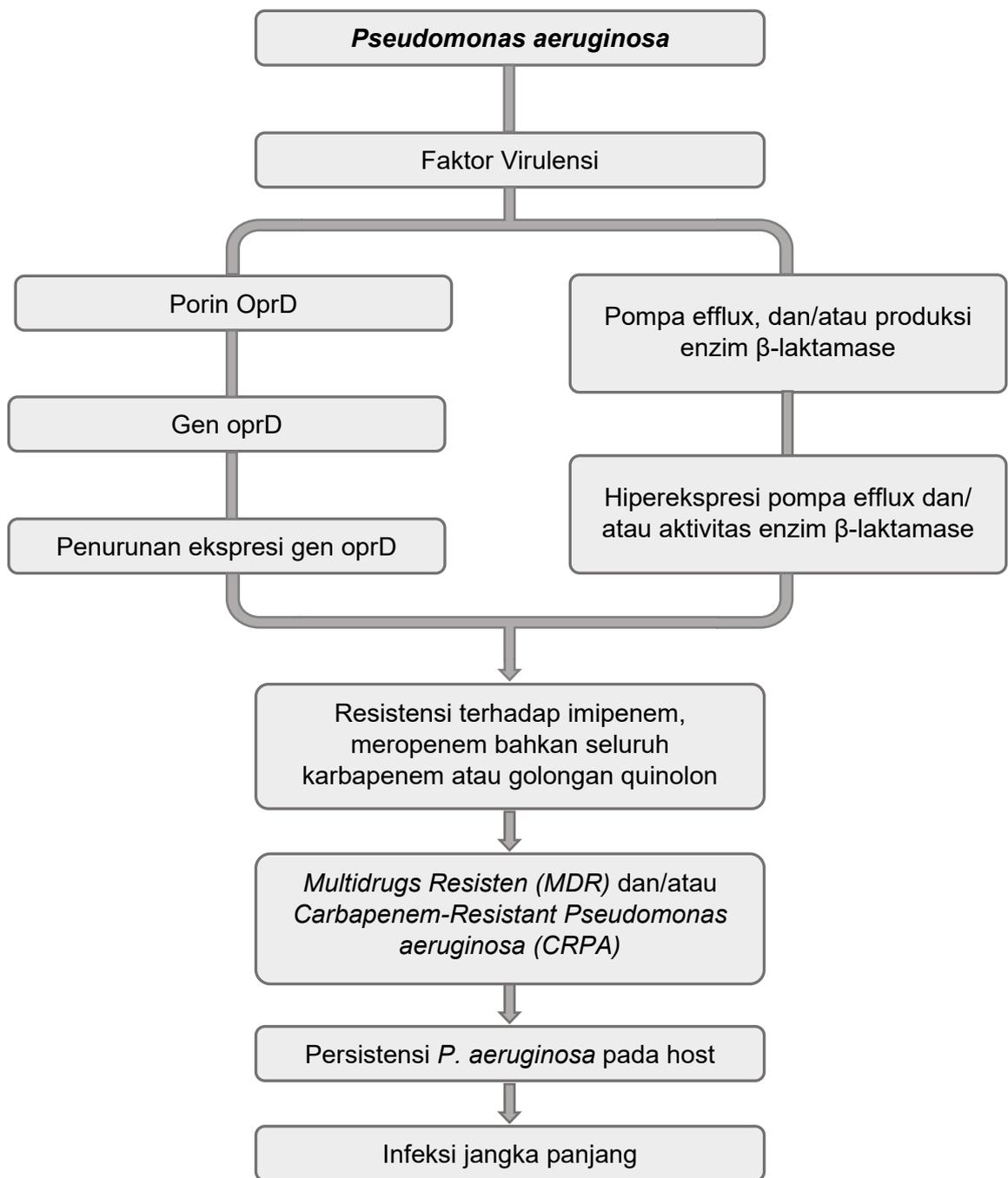
1. Gen oprD yang memiliki mutasi atau tidak memiliki fragmen kecil 11bp. Produk gen ini dapat memperkuat pita yang sesuai untuk dapat terlihat, tetapi untuk membedakan antara penghapusan kecil dan mutasi diperlukan sekuensing lebih lanjut.
2. Gen OprD mengandung penghapusan fragmen 1024-bp, sehingga segmen DNA yang sesuai tidak dapat diamplifikasi, dan hasil elektroforesis negatif.
3. OprD yang mengandung penyisipan, sehingga primer dapat mengamplifikasi fragmen DNA yang sesuai, dan hasil elektroforesis positif.

2.3.6 Deteksi Ekspresi gen oprD *P. aeruginosa*

Untuk mengetahui tingkat transkripsi oprD dilakukan analisis dengan PCR waktu nyata (kuantitatif PCR, qPCR, RT-PCR). Total RNA diekstraksi menggunakan Kit Isolasi RNA dan diubah menjadi cDNA untuk qPCR. Kualitas dan kemurnian RNA yang diperoleh dievaluasi menggunakan spektrofotometri. Sebagai hasil evaluasi, volume yang dibutuhkan dihitung untuk 100 ng cDNA. PCR kuantitatif dilakukan dalam kaca kapiler menggunakan Biorad SYBR Green Master Mix® dengan primer khusus untuk oprD. Kontrol cDNA diperoleh dari *P. aeruginosa* strain PAO1 (Terzi et al., 2015).

Data transkripsi dianalisis menggunakan perangkat lunak *CFX Maestro Software*. Nilai ekspresi relatif ditentukan menggunakan metode ' $\Delta\Delta C_t$ ', dan gen pengkode β -actin digunakan sebagai kontrol internal dari masing-masing sampel *P. aeruginosa*. Strain *P. aeruginosa* PAO1 digunakan sebagai standar untuk kadar relatif mRNA. Pengurangan ekspresi oprD didefinisikan jika tingkat transkripsi $\leq 70\%$ dari isolat PAO1. Dimer primer dan artefak lainnya dievaluasi dengan analisis kurva leleh. Untuk memastikan bahwa amplifikasi spesifik telah terjadi, kurva leleh dari setiap amplikon dinilai dan dibandingkan dengan nilai T_m yang diperoleh dengan menggunakan sebagai template (Terzi et al., 2015).

2.4 Kerangka Teori



Gambar 2.7 Kerangka teori