

**DETEKSI KARIER GEN PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM*
BETALACTAMASE DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*
PADA SPESIMEN FESES SISWA SEKOLAH DASAR
DI SULAWESI SELATAN**



FIRDAUS

C119216202

PEMBIMBING :

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

dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K)

PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI KLINIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

**DETEKSI KARIER GEN PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM*
BETALACTAMASE DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*
PADA SPESIMEN FESES SISWA SEKOLAH DASAR
DI SULAWESI SELATAN**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Spesialis

Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis

Disusun dan diajukan oleh

FIRDAUS

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)
DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

TESIS

DETEKSI KARIER GEN PENYANDI EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE DARI SPESIMEN FESES PADA SISWA SEKOLAH DASAR DI SULAWESI SELATAN

Disusun dan diajukan oleh

FIRDAUS
NOMOR POKOK C119216202

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Spesialis Program Studi Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 16 Juni 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan



Menyetujui,

Komisi Penasihat,

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

dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K)
Anggota

Ketua Program Studi
Mikrobiologi Klinik,

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K)
NIP. 19570416 198503 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,



Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.MedEd.
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Firdaus
No. Stambuk : C119216202
Program Studi : Mikrobiologi Klinik

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

Makassar, 03 Agustus 2021

Yang menyatakan,

 Firdaus

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim. Assalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat limpahan rahmat dan ridho-Nya saya dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Deteksi Karier Gen Penghasil Extended Spectrum Betalactamase Dengan Metode Polymerase Chain Reaction Pada Spesimen Feses Siswa Sekolah Dasar Di Sulawesi Selatan”. Solawat serta salam tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Dengan selesainya tesis ini saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof.dr. Budu, Ph.D.,Sp.MK(K),M.Med.Ed sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas izin dan kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan dokter spesialis di Program Studi Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
2. dr. Rizalinda, M.Sc.,Ph.D.,Sp.MK sebagai Ketua Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Prof. dr. Mochammad Hatta, Sp.MK.(K),Ph.D. dan dr. Yoeke Dewi Rasita, M.MedKlin., Sp.MK selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
3. Prof. dr. Mochammad Hatta, Sp.MK.(K),Ph.D. sebagai pembimbing pertama dan dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K) sebagai Pembimbing kedua, saya ucapkan terima kasih banyak atas semua didikan, arahan, bimbingan waktu yang telah diluangkan untuk membimbing, memotivasi dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
4. Dr. dr. Yuyun Widaningsih, M.Kes., Sp.PK, Dr.dr. Risna Halim, Sp.PD.,K-PTI, FINASIM dan Dr.dr. A. Alfian Zainuddin.,MKM sebagai penguji tesis saya, saya ucapkan terima kasih atas segala masukan, kebaikan, didikan, bimbingan, dan umpan balik yang disampaikan selama penyusunan tesis ini.
5. Seluruh Staf Pengajar dan guru-guru saya di Program Studi Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, terima kasih atas segala bimbingan dan kesabaran dalam mendidik sehingga saya dapat menyelesaikan seluruh tahapan pendidikan ini dengan lancar, semoga ilmu yang telah diberikan dapat menjadi bekal, memberikan kemanfaatan bagi sesama dan menambah keberkahan.
6. Segenap Staf di Departemen Mikrobiologio dan Staf di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, terima kasih atas bantuannya.

Demikian pula ucapan terima kasih kami sampaikan khusus kepada Istriku tercinta “dr. Bramantyas Kusuma Hapsari, M.Sc” dan anak-anakku tercinta “Andi Zahir Kusumo Firdaus, Andi Raihana Kusuma Firdaus dan Andi Abdurrahman Kusumo Firdaus” yang telah memberikan semangat, kasih sayang, perhatian dan dukungan yang tiada henti sehingga penulis dalam menyelesaikan tesis ini dan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada alm. Ayahanda dan Alm. Ibunda saya serta ayahanda mertua dan Ibunda mertua saya serta saudara-saudaraku yang senantiasa memberikan bantuan kepada penulis baik moral maupun materil serta doa yang tak putus-putusnya sehingga meringankan langkah penulis dalam menyelesaikan Tesis ini.

Terima kasih kepada semua pihak yang namanya tidak tercantum tapi telah membantu dalam proses pendidikan penulis dan telah menjadi inspirasi dan pelajaran berharga bagi penulis. Doa terbaik saya panjatkan semoga Allah SWT memberi balasan berlipat untuk setiap dukungan yang telah diberikan.

Wassalamu’Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Makassar, Agustus 2021

Firdaus

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SKEMA	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 LATAR BELAKANG	1
1.2 RUMUSAN MASALAH	4
1.3 TUJUAN PENELITIAN.....	5
1.4 MANFAAT	5
BAB 2 . TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Escherichia coli</i>	6
2.2 <i>EXTENDED BETALAKTAMASE</i>	8
2.2.1 Definisi	8
2.2.2 Epidemiologi	9
2.2.3 Prosedur Laboratorium	11
2.2.4 Klasifikasi β -Laktamase	16
2.3 <i>PCR</i>	29
2.4 Kerangka Teori	33
2.5 Kerangka Berpikir	34
2.6 Hipotesis	34
BAB 3. METODE PENELITIAN	35
3.1 DESAIN PENELITIAN.....	35
3.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN	35
3.3 DEFINISI OPERASIONAL	35
3.4 POPULASI DAN SAMPEL	36
3.5 KRITERIA SAMPEL	36
3.6 IZIN PENELITIAN DAN ETHICAL CLEARANCE	36
3.7 ALUR PENELITIAN.....	37
3.8 ALAT DAN BAHAN	38
3.9 PROSEDUR PENELITIAN.....	38
3.9 TEHNIK ANALISIS.....	41

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 DESKRIPSI HASIL PENELITIAN.....	42
4.2 PEMBAHASAN	45
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 KESIMPULAN	49
5.2 SARAN.....	49
DAFTAR PUSTAKA	51

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Tehnik mendeteksi ESBLs secara molekuler.....	15
Tabel 2	Klasifikasi β -laktamases menurut skema Molekuler Amber.....	18
Tabel 3	Perubahan bentuk original skema klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros untuk bakteri.....	18
Tabel 4	Karakteristik β -laktamase tipe TEM.....	22
Tabel 5	Karakteristik β -laktamase tipe SHV.....	25
Tabel 6	Karakteristik β -laktamase tipe CTX-M.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Penampakan mikroskopis <i>Escherichia coli</i> hasil pewarnaan gram dan koloni pada agar <i>MacConkey</i>	8
Gambar 2	Tingkat karier <i>ESBL-E</i> di masyarakat, berdasarkan pada distribusi geografis dan temporal.....	9
Gambar 3	Representasi reservoir pencernaan atau lingkungan utama dari <i>ESBL-E</i> dimana komunitas manusia sedunia berada dan juga terpapar.....	11
Gambar 4	<i>Double-disk diffusion</i>	13

DAFTAR SKEMA

Skema 1	Substitusi asam amino pada turunan TEM <i>ESBL</i>	21
Skema 2	Substitusi asam amino pada turunan <i>ESBL</i> tipe SHV.....	22

ABSTRAK

Pendahuluan: Feses yang mengandung bakteri *extended-spectrum β -lactamase* (ESBL) merupakan risiko potensial untuk penularan dan infeksi. Genotipe yang diketahui berasosiasi dengan *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL adalah sefotaksimase (CTX-M), temoniera (TEM), dan variabel sulfhidril (SHV). Namun, data prevalensi ESBL di Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan masih terbatas, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut pada masyarakat.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi carier fekes *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL pada anak usia sekolah dasar di Sulawesi Selatan, Indonesia.

Metode: Penelitian dilakukan pada anak usia sekolah di Sulawesi Selatan, Indonesia. Deteksi gen ESBL menggunakan metode polymerase chain reaction (PCR). Sebanyak 245 sampel tinja dikumpulkan.

Hasil: Prevalensi pembawa tinja *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL pada anak sekolah adalah 76,7% (188/245). Genotipe gen pengkode *Enterobacteriaceae* penghasil EBSL menggunakan PCR menemukan bahwa gen TEM, 92,6% (174/188), lebih tinggi dari gen SHV, 38,8% (73/188) dan gen CTX-M, 4,3% (8/188). Itu juga mengungkapkan kombinasi gen penghasil ESBL dari *Enterobacteriaceae*. Gen kombinasi paling banyak ditemukan pada gen TEM+SHV, antara lain 55 dari 188 (29,26%).

Kesimpulan: Dengan adanya carier gen ESBL menunjukkan bahwa resistensi antibiotik telah menyebar di masyarakat, yang perlu menjadi perhatian karena dapat menjadi reservoir gen ESBL yang dapat ditularkan ke banyak bakteri patogen.

Kata kunci: Anak usia sekolah dasar, *Enterobacteriaceae*, *Extended-Spectrum β -Lactamase*, Genotipe, *Polymerase Chain Reaction*

ABSTRACT

Background: Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria is a potential risk for transmission and infection. Genotypes known to be associated with ESBL-producing Enterobacteriaceae are cefotaximases (CTX-M), temoniera (TEM), and sulfhydryl variable (SHV). Unfortunately, data on ESBL prevalence in Indonesia, especially in South Sulawesi, is still limited, so further research on the community is needed.

Objectives: This study aimed to investigate the prevalence of fecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae among school children in South Sulawesi, Indonesia.

Methods: The research was conducted among school-children in South Sulawesi, Indonesia. Detection of ESBL gene using polymerase chain reaction (PCR) methods. A total of 245 stool samples were collected.

Results: The prevalence of fecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae among school children was 76.7% (188/245). Genotyping of ESBL-producing Enterobacteriaceae encoding genes using PCR found that TEM genes, 92.6% (174/188), were higher than SHV genes, 38.8% (73/188) and CTX-M genes, 4.3% (8/188). It was also revealed a combination of ESBL-producing genes of Enterobacteriaceae. The most combination genes were found in TEM + SHV genes, including 55 of 188 (29.26%).

Conclusions: The presence of ESBL gene carriers suggests that antibiotic resistance has spread in the community, which needs to be of concern since it can be an ESBL gene reservoir that can be transmitted to many pathogenic bacteria.

Keywords: Schoolchildren, Enterobacteriaceae, Extended-Spectrum β -Lactamase, Genotypes, Polymerase Chain Reaction

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Resistensi antibiotik telah dikenal lebih dari 50 tahun yang lalu dan telah menjadi tantangan terbesar abad ini baik di rumah sakit maupun di komunitas (Levy, S.B, 1998 & Cars O et al, 2008). *World Health Organisation* memasukkan resistensi antibiotik sebagai salah satu dari tiga ancaman utama terhadap kesehatan global (WHO, 2012). Salah satu masalah resistensi yang mengalami peningkatan pesat ditemukan pada bakteri gram negatif yang berdampak pada peningkatan angka kematian, morbiditas dan pembiayaan sistem kesehatan (WHO, 2012, Yezli S & Li H, 2012; Heddimi A et. al, 2009). Resistensi antibiotik bakteri gram negatif khususnya terhadap golongan sefalosporin generasi ketiga dan keempat yang merupakan kelas antibiotik yang paling penting dan banyak digunakan (Hawkey PM & Jones AM 2009). Resistensi dari bakteri ini sering ditemukan sebagai *Multi Drug Resistance Bacteria (MDRB)* sehingga membuat pengobatan infeksi dengan bakteri ini sulit (Doumith M, et. al 2012). Salah satu bentuk *MDRB* dari bakteri basil gram negatif ini adalah *Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs)*

Enzim β -laktamase pertama kali diidentifikasi dari isolat *Escherichia coli* pada tahun 1940 sebelum penisilin dikeluarkan untuk digunakan dalam

praktek medis (Abraham EP, 1940). Enzim β -laktamase pertama kali diidentifikasi dari isolat klinis di Jerman pada tahun 1983 dan awal 1990-an merupakan awal terjadinya wabah infeksi nosokomial (Rice L.B, 1990). Pada abad 21 perhatian ditujukan pada *community-acquired ESBLs* karena semakin banyaknya kasus yang bermunculan yang berakibat pada pemilihan antibiotik yang terbatas. Sebelum tahun 2008, prevalensi karier *ESBLs* di komunitas selalu berada di bawah 10% akan tetapi setelah itu cenderung semakin meningkat (Sasaki T, 2010). Pada saat ini penelitian banyak tertuju pada feses karier bakteri resisten asimtomatik.

Feses karier bakteri resisten asimptomatik, seperti *Enterobacteriaceae* yang memproduksi *ESBLs*, menimbulkan tantangan kesehatan utama di seluruh dunia (Woerther P-L e. al, 2013& Hassing RJ et. al 2015). Tidak seperti infeksi yang disebabkan oleh patogen multiresisten lainnya seperti *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Vancomycin-Resistant-Enterococcus* (VRE) dan *Pseudomonasspp*. Infeksi yang disebabkan oleh *ESBLs-producing Escherichia coli* (*EPE*) sering didapat di masyarakat dan bukan di tempat layanan kesehatan. (CoqueTM, et. al 2008). Infeksi bakteri penghasil *ESBLs* pada suatu individu di masyarakat cenderung ditemukan adanya kolonisasi *EPE* di usus (Ara´nzazu Valverde, et. al 2008). Feses karier *EPE* biasanya didahului oleh infeksi klinis, seperti infeksi saluran kemih yang terkait dengan peningkatan risiko tertular infeksi yang lebih parah. Hal ini mengakibatkan sulitnya mengobati

infeksi berat. Selain itu, kebutuhan untuk pengobatan empiris menjadi lebih luas terhadap infeksi berat, seperti *Blood Stream Infection (BSI)* (Tumbarello M et. al, 2008). Di Swedia, karier *EPE* penyebab *BSI* meningkat dari 2,3% di tahun 2007 menjadi 5,4% pada tahun 2014, yang merupakan peningkatan yang signifikan (*Public Health Agency of Sweden, 2014*). Kolonisasi satu individu mungkin terjadi, jika terus berlanjut, menyebar ke anggota keluarga lainnya dan transfer horizontal gen resistensi ke patogen usus lainnya juga dapat terjadi (Valverde A et. al, 2008; Rodriguez-Bano J et. al, 2008, & Lo WU et. al, 2010).

Secara keseluruhan, pengetahuan tentang feses karier bakteri penghasil *ESBLs* masih terbatas. Feses karier bakteri penghasil *ESBLs* di masyarakat telah dilaporkan di beberapa Negara dan benua dengan perbedaan tingkat karier yang signifikan antara wilayah geografis dan karakteristik populasi penelitian. Prevalensi karier *Enterobacteriaceae* penghasil *ESBLs* tipe CTX-M (*cefotaxime*) yang sangat tinggi baru-baru ini dilaporkan dari Thailand sebesar 65,7% yang diidentifikasi dari 417 sampel feses yang diperoleh dari masyarakat dewasa yang tinggal di daerah rural (Luvsansharav UO, dkk 2012). Di propinsi Sandong, China, pada tahun 2012 spesimen feses dikumpulkan dari 3 kabupaten dan 18 pedesaan menunjukkan karier *ESBLs* yang tinggi yaitu 42% (Qiang Sun et. al., 2014). Di Mesir 632 spesimen feses dari individu yang sehat menunjukkan 400 isolat (63.3%) penghasil *ESBLs* yang terdiri dari 285 isolat *Escherichia coli*(71.25%)

dan 96 (24.0%) *Klebsiella pneumoniae* (Abdul Rahman EM & El-Sherif RH, 2011). Sebagai perbandingan, tingkat karier yang sangat rendah (3%) dilaporkan dari Swedia (Stroömdahl H, et al. 2011). Di Indonesia, karier feses *Enterobacteriaceae* penghasil *ESBLs* sebagai flora normal dominan di Indonesia kebanyakan secara khusus merupakan *hospital-associated faecal carriage ESBLs* sedangkan *Enterobacteriaceae* penghasil *ESBLs* pada orang sehat atau orang yang mengunjungi Pusat Kesehatan tidak ada yang terdeteksi (Severin J Aet al, 2012).

Berdasarkan pada paparan di atas, maka penulis merasa tertarik untuk melakukan penelitian mengenai deteksi gen *CTX-M*, *SHV* dan *TEM* penghasil *ESBLs* pada siswa Sekolah Dasar di Sulawesi Selatan.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Semakin tingginya angka *community acquired infection* dan angka karier *EPE* di beberapa negara serta adanya faktor risiko di beberapa daerah di Propinsi Sulawesi Selatan maka peneliti memunculkan rumusan masalah yaitu apakah terdapat karier gen penghasil *ESBLs* yang terdeteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada siswa Sekolah Dasar di Propinsi Sulawesi Selatan ?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 Tujuan Umum

Adapun tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya karier gen penghasil *ESBLs* pada Siswa Sekolah Dasar di Sulawesi Selatan

1.3.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus dari penelitian ini yaitu :

1. Untuk mendeteksi gen CTX-M, SHV, dan TEM dari *EPE* pada spesimen feses siswa Sekolah Dasar di Propinsi Sulawesi Selatan
2. Untuk mengetahui prevalensi karier gen penghasil *ESBLs* pada siswa Sekolah Dasar di Propinsi Sulawesi Selatan

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Setelah penelitian ini dilakukan maka diharapkan membawa manfaat, diantaranya :

1. Gambaran prevalensi karier *EPE* asimtomatik di komunitas Sulawesi Selatan
2. Diperolehnya data yang dapat dijadikan sebagai landasan dalam pengambilan kebijakan penggunaan dan penyediaan antibiotik khususnya di Sulawesi Selatan

BAB 2

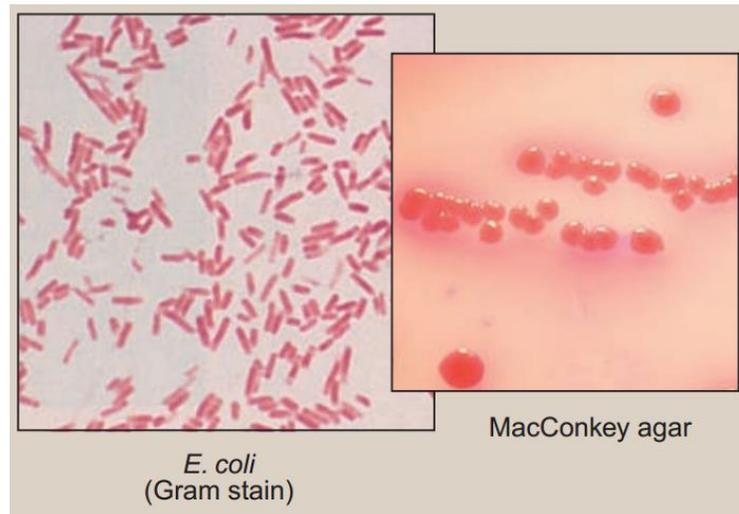
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bagian dari flora normal usus besar pada manusia dan hewan lainnya. Namun dapat menjadi patogen baik di dalam maupun di luar saluran pencernaan dan beberapa strain lainnya dapat bersifat oportunistik. (Talaro, K P & Chess B, 2008, & Cornelissen C. N et al, 2013). Selain itu *Escherichia coli* banyak terdapat di air limbah dan air yang terkontaminasi. *Escherichia coli* adalah satu-satunya spesies genus *Escherichia* yang bermanifestasi klinis secara signifikan dapat menyebabkan diare, gastroenteritis, septikemia, meningitis neonatal dan penyebab tersering kasus infeksi saluran kemih (ISK) (Mishra, S.K & Agrawal, D. 2013). Perbedaan tingkat virulensi berbagai strain *Escherichia coli* berkorelasi dengan akuisisi plasmid, prophages terintegrasi, dan *pathogenicity islands*. *Escherichia coli* memiliki fimbriae atau pili yang penting untuk melekatkan ke permukaan mukosa host. (Talaro, K P & Chess B, 2008, & Cornelissen C. N et al, 2013)

Escherichia coli mempunyai banyak kemiripan karakteristik dengan *Enterobacteriaceae* lainnya (Talaro, K P & Chess B, 2008). Diidentifikasi dengan pewarnaan gram, morfologi, fisiologis dan biokimia. Secara mikroskopis morfologinya kecil berbentuk basil dengan sifat gram negatif (Cornelissen C. N et al, 2013). Mereka semua adalah fakultatif anaerob,

semuanya memfermentasi glukosa, dan semuanya dapat menghasilkan energi dengan respirasi aerob atau anaerobik (menggunakan nitrat, nitrit, atau fumarat sebagai akseptor elektron terminal). Mereka semua tidak memiliki sitokrom c oksidase (yaitu, mereka bersifat oksidase negatif) (Talaro, K P & Chess B,2008). Berbagai strain ada yang bersifat motil atau nonmotile. Sebagian besar strain dapat memfermentasi laktosa (yaitu *Lac +*) berbeda dengan patogen usus utama seperti *Salmonella* dan *Shigella*, yang tidak dapat memfermentasi laktosa (yaitu *Lac -*). *Escherichia coli* menghasilkan asam dan gas selama fermentasi karbohidrat. Pada uji *methyl red* dan indol menunjukkan hasil positif dan reaksi negatif untuk uji *Voges-Proskauer* dan sitrat, hasil tes ini yang membedakannya dari genera enterik umum lainnya.. Gambaran koloni pada medium agar *mac conkey* datar dengan berwarna merah atau *pink*, pada medium agar *methilen blue eosin* tampak berkilau seperti logam dan pada medium agar *hektoen* berwarna kuning-orange, sedangkan pada medium agar *bismuth sulfite* dan *Brilliant green* tidak dapat tumbuh. (Cornelissen C. N et al, 2013)



Gambar 1. Penampakan mikroskopis *Escherichia. coli* hasil pewarnaan gram dan koloni pada agar *MacConkey* (Cornelisse C. N., et. al 2013)

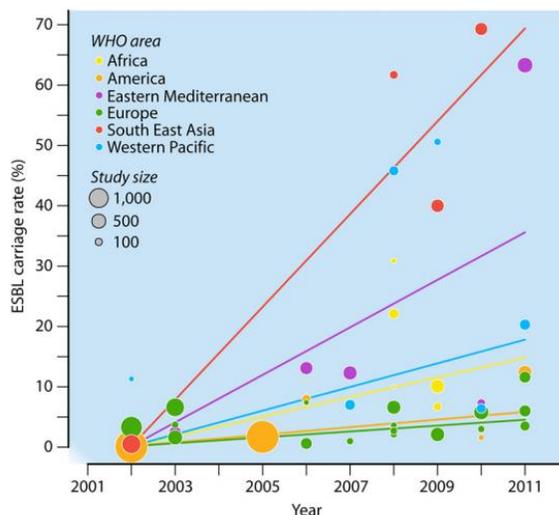
2.2 EXTENDED BETALAKTAMASES

2.2.1 Definisi

Extended betalaktamases adalah Enzim yang dimediasi oleh plasmid yang mampu menghidrolisis antibiotik golongan β -laktam meliputi *oxymino* seperti *oxymino-cephalosporins* (meliputi *ceftazidime*, *cefotaxime*, dan *ceftriaxone*) dan *oxymino-monobactam* (seperti *aztreonam*), kecuali *cephamycins*(meliputi *cefoxitin* and *cefotetan*) and *carbapenems* (meliputi *meropenem*atau *imipenem*) (CDC,2010; Paterson DL &Bonomo, R.A, 2005;Burgess, D. S. et. al, 2003; Paterson, D.L et. al, 2001)

2.2.2 Epidemiologi

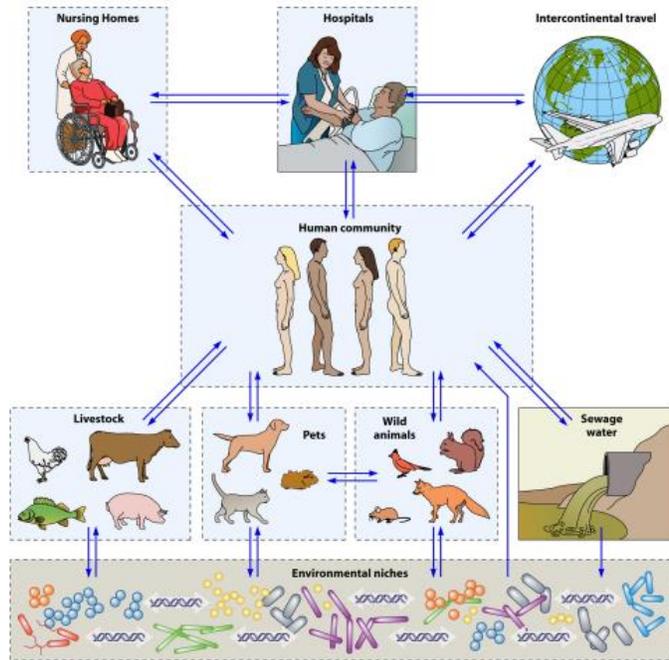
Di semua wilayah, tingkat karier komunitas *Extended-Spectrum Beta-lactamase-producing Enterobacteria (ESBL-E)* dilaporkan hampir selalu di bawah 10% sebelum tahun 2008 namun setelahnya semakin meningkat (Gambar 2). Pada tahun 2008, tingkat karier melonjak menjadi lebih dari 60% untuk pertama kalinya, di Thailand (Sasaki T, et. al, 2010).



Gambar 2. Tingkat karier *ESBL-E* di masyarakat, berdasarkan pada distribusi geografis dan temporal. Setiap area gelembung sebanding dengan jumlah studi yang sesuai. Garis tersebut mewakili evolusi tingkat karier *ESBL-E* dari waktu ke waktu untuk setiap wilayah geografis, sebagaimana ditetapkan oleh model regresi linier dengan menggunakan nilai yang dilaporkan dalam literatur dari tahun 2002 sampai 2011. Selama periode ini, karier *ESBL-E* meningkat secara signifikan secara bervariasi pada semua daerah. Di Eropa, tingkat karier *ESBL-E* meningkat secara signifikan sebesar 0,5% per tahun dari tahun 2002 sampai 2011 (95% confidence interval [95% CI] 0,04% menjadi 0,90%; P 0,03). Dibandingkan dengan kenaikan di Eropa, tingkat perkembangan tidak berbeda di Afrika (perbedaan dalam perkembangan tahunan dibandingkan dengan di Eropa, 1,1% [95% CI 0,4% sampai 2,7%]; P 0,1) atau Amerika (0,1% [95% CI 0,6% sampai 0,9%]; P 0,7) namun secara signifikan lebih tinggi di Asia Tenggara (7,2% [95% CI 5,1% sampai 9,2%]; P 10 7), wilayah Mediterania Timur (3,5% [95% CI 2,0% Menjadi 4,9%]; P 10 4), dan wilayah Pasifik Barat (1,5% [95% CI 0,04% sampai 2,90%]; P 0,04). Perbedaan tingkat kenaikan yang signifikan terlihat di Asia Tenggara, kawasan Mediterania Timur, dan kawasan Pasifik Barat.(Woerther, PL, 2013)

Meskipun meningkat dari waktu ke waktu, karier *ESBL-E* berevolusi dengan dinamika yang tidak sama (Gambar 2). Variasi intra dan interregional yang besar telah diamati. Laporan dari kawasan Pasifik Barat, Mediterania Timur, dan Asia Tenggara menunjukkan tingkat karier tertinggi dan tren kenaikan yang paling mencolok. Sebaliknya, tingkat yang dilaporkan di Eropa tidak pernah melebihi 10%, kecuali laporan terbaru 11,6% yang diamati pada tahun 2011 di antara pasien saat berkunjung ke unit geriatri di Belgia (Schoevaerds D et. al 2012). Data dari melalui industri makanan sekarang sangat disarankan melihat perbandingan genetik strain dari kedua setting tersebut (Kluytmans JA et. al 2013&Leverstein-van Hall MA et al 2011). Akhirnya, hewan peliharaan juga terlibat, seperti yang disarankan oleh laporan dari Portugal mengenai hewan karier yang sehat (Costa D et. al 2004) dan oleh laporan tentang hewan yang terinfeksi di Amerika Serikat (O'Keefe A et. al 2010), China (Sun Y, et. al 2010), dan Swiss (Huber H et. al 2013). Penularan dari hewan peliharaan ke manusia disarankan untuk membandingkan latar belakang genetik strain dan alel CTX-M (Ewers C, et al 2010&Platell JL, et. al 2011), namun rute transmisi manusia ke hewan peliharaan juga telah diusulkan (Johnson JR, et. al 2009) (Gambar 4). Selain itu, penyebaran beberapa strain mungkin terbatas pada hewan peliharaan, seperti yang terlihat pada sebuah penelitian baru-baru ini yang menjelaskan *Klebsiella pneumoniae* klon spesifik dengan plasmid ESBL genetik mereka

sendiri telah diisolasi secara eksklusif dari hewan peliharaan (Poirel L, et. al 2013).



Gambar 3. Representasi reservoir pencernaan atau lingkungan utama dari *ESBL-E* dimana komunitas manusia sedunia berada dan juga terpapar. Setiap reservoir independen termasuk dalam garis besar hitam putus-putus, di mana transmisi silang dapat terjadi. Panah menunjukkan *fluks ESBL-E* dari satu reservoir yang lain. *Environmental niches* terdiri dari air, tanah, dan tanaman, dimana pertukaran bahan genetik antara bakteri pencernaan dan/ atau lingkungan terjadi (Woerther, PL, 2013)

2.2.3 Prosedur Laboratorium

2.2.3.1 Tes Skringing

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) telah mengembangkan skrining *broth microdilution* dan uji *disk diffusion* dengan

menggunakan agen antimikroba terpilih. Setiap *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, atau isolat *Escherichia coli* harus dianggap sebagai produsen *ESBLs* potensial jika hasil pengujiannya adalah sebagai berikut:

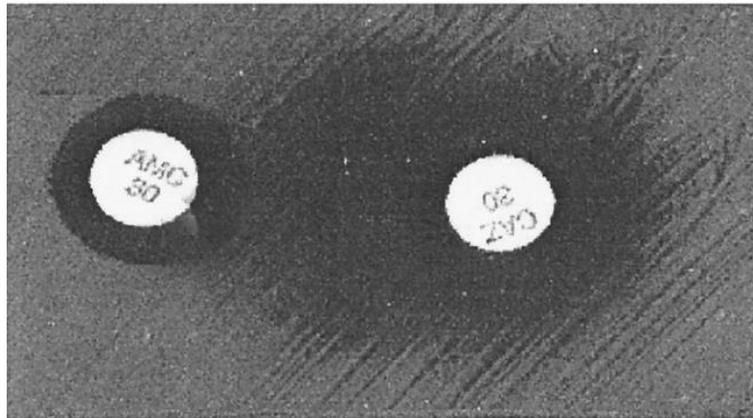
<i>Disk diffusion</i>	<i>MICs</i>
<i>Cefpodoxime</i> ≤ 22 mm	<i>cefpodoxime</i> ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
<i>ceftazidime</i> ≤ 22 mm	<i>ceftazidime</i> ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
<i>aztreonam</i> ≤ 27 mm	<i>aztreonam</i> ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
<i>cefotaxime</i> ≤ 27 mm	<i>cefotaxime</i> ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
<i>ceftriaxone</i> ≤ 25 mm	<i>ceftriaxone</i> ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$

Sensitivitas skrining untuk *ESBLs* pada bakteri enterik dapat bervariasi, tergantung pada agen antimikroba yang diuji. Penggunaan lebih dari satu dari lima agen antimikroba yang disarankan untuk skrining akan memperbaiki sensitivitas deteksi. *Cefpodoxime* dan *ceftazidime* menunjukkan sensitivitas tertinggi untuk deteksi *ESBLs* (CDC, 2010).

2.2.3.2 Tes Konfirmasi

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) merekomendasikan melakukan konfirmasi fenotip pada isolat yang berpotensi menghasilkan *ESBLs Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, atau *Escherichia coli* dengan menguji tunggal menggunakan *cefotaxime* dan *ceftazidime* dan dikombinasikan dengan asam klavulanat. Pengujian dapat dilakukan dengan metode *broth microdilution* atau dengan *disk difusion*. Untuk pengujian *MIC (Minimum Inhibitory Concentration)*, penurunan > 3

pengenceran dua kali lipat dalam *MIC* untuk *cefotaxime* atau *ceftazidime* yang diuji dalam kombinasi dengan asam klavulanat 4 µg/ml, *MIC* dibandingkan saat diuji sendiri, untuk mengkonfirmasi bakteri penghasil *ESBLs*. Untuk pengujian *disk difusion*, kenaikan 5 mm dalam diameter zona untuk agen antimikroba yang diuji dengan asam klavulanat versus zonanya saat diuji sendiri mengkonfirmasi mikroorganisme tersebut penghasil *ESBLs*.



Gambar 4. *Double-disk diffusion*. Sebuah disk yang mengandung *amoxicillin-clavulanate* (AMC) ditempatkan dekat dengan disk *ceftazidime* (CAZ) atau *oxyimino-cephalosporin* lainnya. *Clavulanate* pada disk *amoxicillin-clavulanate* berdifusi dengan agar dan menghambat laktamase disekitar disk *ceftazidime*. Peningkatan zona disk *ceftazidime* disk tampak disekitar disk *amoxicillin-clavulanate* yang berarti menunjukkan hasil yang positif. (Bradford, P. A. 2001)

National Committee for Clinical Laboratory Standards menyarankan untuk membuat disk dengan menambahkan 10 µl larutan larutan 1000 µg/ml asam klavulanat ke disk *cefotaxime* dan *ceftazidime* setiap hari pengujian. Uji konfirmasi fenotip tidak mendeteksi semua *ESBLs*. Beberapa organisme dengan *ESBLs* mengandung β-laktamase lain yang dapat menutupi produksi

ESBLs dalam uji fenotip sehingga menghasilkan uji negatif palsu. β -laktamase ini termasuk AmpCs dan *inhibitor-resistant TEMs (IRTs)*. *Hiperproduksi TEM* dan/atau *SHV* β -laktamase pada organisme dengan *ESBL* juga dapat menyebabkan hasil uji konfirmasi fenotip negatif palsu. Saat ini, deteksi organisme dengan beberapa β -laktamase yang dapat mengganggu uji konfirmasi fenotip hanya dapat dilakukan dengan menggunakan fokus isoelektrik dan sekuensing DNA, metode tersebut biasanya tidak tersedia di laboratorium klinis. (CDC, 2010)

2.2.3.3 Deteksi Molekuler

Tes yang dijelaskan di atas hanya secara menduga mengidentifikasi keberadaan *ESBLs*. Pengidentifikasiian *ESBLs* spesifik yang ada dalam isolat klinis lebih rumit. Di awal penelitian tentang *ESBLs*, penentuan titik isoelektrik biasanya cukup untuk mengidentifikasi *ESBLs* yang ada. Namun, dengan adanya 90 *TEM-type-lactamases*, banyak di antaranya memiliki titik isoelektrik yang sama, penentuan *ESBLs* melalui titik isoelektrik tidak mungkin lagi dilakukan. Situasi serupa ditemukan di keluarga *SHV*, *CTX-M*, dan *OXA* dari *ESBLs*. (Bradford P. A, 2001)

Tabel 1. Tehnik mendeteksi *ESBLs* secara molekuler (Bradford P. A, 2001)

Tes molekuler	Kelebihan	Kekurangan
<i>DNA probes</i>	Spesifik untuk family gen (seperti TEM atau SHV)	Intensif Laboratorium, tidak bisa membedakan antar varian pada TEM atau SHV
PCR	Mudah dilakukan, spesifik untuk gen family (seperti SHV & TEM)	Tidak bisa membedakan antara ESBLs dan non ESBLs, tidak bisa membedakan antar varian TEM atau SHV
Oligotiping	Mendeteksi varian spesifik tem	Membutuhkan probe oligonukleotida spesifik, intensif labor, tidak bisa medeteksi varian baru
PCR-RFLP	Mudah dilakukan, dapat mendeteksi perubahan nukleotida spesifik	Pergantian nukleotida harus menghasilkan perubahan site restriksi untuk deteksi
PCR-SSCP	bisa membedakan diantara sejumlah varian SHV	Membutuhkan kondisi elektroforesis special
LCR	Dapat membedakan diantara sejumlah varian SHV	Membutuhkan primer oliginukleotida dalam jumlah banyak
Sekuensing nukleotida	Gold standar, dapat mendeteksi semua varian	Intensif laboratorium, secara tehnik menantang, sulit utnuk menginterpretasi dengan metode manual

Deteksi dini gen-laktamase dilakukan dengan menggunakan *DNA probe* yang spesifik untuk enzim *TEM* dan *SHV* (Arlet, G., & A. Philippon. 1991, Gallego, L., A et. al, 1990, Huovinen, S., et al, 1988). Namun, dengan menggunakan *DNA probe* terkadang memerlukan sarana laboratorium yang lengkap. Metode molekuler termudah dan paling umum digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen-laktamase yang termasuk dalam famili enzim

adalah PCR dengan primer oligonukleotida yang spesifik untuk gen-laktamase. Primer ini biasanya dipilih untuk anneal ke daerah dimana berbagai mutasi titik tidak diketahui terjadi. Namun, PCR tidak akan membedakan varian *TEM* atau *SHV* yang berbeda. Beberapa metode molekuler yang akan membantu pendeteksian dan diferensiasi *ESBL* tanpa sekuensing telah disarankan (Bradford P. A, 2001).

Urutan nukleotida tetap menjadi standar untuk penentuan gen spesifik-laktamase yang ada dalam untaian. Namun, hal ini juga bisa memberi hasil yang bervariasi tergantung dari metode yang digunakan. Ada kemungkinan beberapa variabilitas yang terlihat dalam rangkaian beberapa *SHV*-laktamase disebabkan oleh penekanan dan kesulitan dalam membaca autoradiografi sekuensing tradisional, bukan perbedaan yang sebenarnya dalam urutan (Bradford, P. A. 1999).

2.2.4 Klasifikasi β -Laktamase

Extended Spectrum Beta Laktamases mengandung sejumlah mutasi yang memungkinkan mereka menghidrolisis spektrum antibiotik beta laktam secara luas. Sebagian besar *ESBL* adalah turunan enzim *TEM* atau *SHV* (Bush, K.et. al, 1995; Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. 1991) Sementara *ESBLs* tipe *TEM* dan *SHV* mempertahankan kemampuan mereka untuk menghidrolisis penisilin, mereka tidak secara katalitis seefisien enzim induknya (Bush, K., and S. B. Singer. 1989). Selain itu, ekspansi situs aktif

memungkinkan peningkatan aktivitas terhadap *expanded-spectrum cephalosporins* juga dapat menyebabkan peningkatan suseptibilitas *ESBLs* terhadap inhibitor beta laktamase (Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. 1991). Sekarang ada 90 jenis TEM-tipe-laktamase dan 25 enzim tipe SHV (urutan asam amino untuk TEM-SHV, dan spektrum-OXA dan *inhibitor-resistant-lactamases*,. Dengan kedua kelompok enzim ini, beberapa titik mutasi pada lokus terpilih dalam gen tersebut menghasilkan fenotip spektrum luas (Bonnet R, 2004).

Beta-laktamase umumnya diklasifikasikan menurut dua skema umum: klasifikasi molekul Ambler dan klasifikasi fungsional Bush-Jacoby-Medeiros (Bush et al., 1995; Ambler, 1980). Metode original kategorisasi β -laktamase adalah klasifikasi Ambler yang membagi enzim menjadi 4 kelas (A, B, C, dan D) berdasarkan struktur molekul. *ESBLs* yaitu kelas A β -laktamase dan dapat didefinisikan sebagai enzim yang dimediasi plasmid yang menghidrolisis *Oxyimino-Cephalosporins*, dan *Monobactams* tetapi tidak *Cephameycins* atau *Carbapenems*. Mereka dihambat secara in vitro oleh *Clavulanate*. Ada berbagai genotipe ESBL. Dari jumlah tersebut, yang paling umum adalah jenis *SHV*, *TEM*, dan *CTX-M* (M. E. Rupp & P. D. Fey, 2003). Jenis klinis penting lainnya termasuk *VEB*, *PER*, *BEL-1*, *BES-1*, *SFO-1*, *TLA*, dan *IBC*.. Pada tahun 1995, Bush et al., merancang klasifikasi β -laktamase berdasarkan karakteristik fungsional dan profil substratnya, klasifikasi yang banyak digunakan. Enzim dibagi menjadi tiga kelompok utama: kelompok 1

Cephalosporinase yang tidak dihambat oleh asam klavulanat, kelompok yang lebih luas 2 enzim spektrum luas yang umumnya dihambat oleh asam klavulanat (kecuali kelompok 2d dan 2f) dan kelompok 3 metallo- β - laktamase. Poin utama diilustrasikan pada Tabel 2.3. Sebagian besar *ESBLs* diberikan ke kelompok 2be, yaitu penisilin hidrolisis, sefalosporin, dan monobaktam, dan dihambat oleh asam klavulanat (sesuai klasifikasi Ambler). Perlu dicatat bahwa genotipe *CTX-M* tidak diklasifikasikan dalam skema asli ini namun masih memenuhi kriteria di atas untuk enzim grup 2be (Rishi H.-P.Dhillon & John Clark. 2012)

Tabel 2. Klasifikasi β -laktamases menurut skema Molekuler Amber

Kelas	β -laktamases	Contoh
A	Broad spectrum β -laktamases	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	<i>ESBL TEM-type</i>	TEM-3
	<i>ESBL SHV-type</i>	SHV-5
	<i>ESBL CTX-type</i>	CTX-M1, CTX-M9
	<i>Carbapenemases</i>	KPC
Serine β -laktamases	C AmpC Cephamecinases (chromosomal encode) cephamecinase (plasmid encode)	AmpC CMY, DHA
D	Broad spectrum β - lactamases <i>ESBL</i>	OXA-1, OXA-9, OXA-2, OXA-10, OXA-48, OXA-23
	OXA- type carbapenemases	
Metallo β -laktamases	B Metallo β - lactamases	VIM, IMP

Tabel 3. Perubahan bentuk original skema klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros untuk bakteri

Group Bush-Jacoby	Kelas Molekuler	Preferred substrates	Representative enzymes	Resisten atau sensitif terhadap inhibitor β -

				lactamases
1	C	<i>Cephalosporins</i>	AmpC	Resisten
2b	A	<i>Penicilins,</i> <i>Cephalosporins</i>	TEM, SHV	sensitif terhadap inhibitor β – lactamases
2be	A	<i>Penicilin,</i> <i>extended-</i> <i>spectrum</i> <i>cephalosporin,</i> <i>monobactam</i>	TEM, SHV	Suseptibel
2d	D	<i>Penicilins,</i> <i>cloxacillin,</i>	OXA	Resisten
2e	A	<i>Cephalosporin</i>	<i>Inducible</i> <i>cephalosporinase</i> <i>from Proteus</i> <i>vulgaris</i>	Sensitif
2f	A	<i>Penicilins,</i> <i>cephalosporin,</i> <i>carbapenems</i>	<i>NMC-A</i> <i>from</i> <i>enterobacter</i> <i>cloaceae</i>	Sensitif
3	B	Most β -lactam including carbapenems	LI <i>from</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	Sensitive

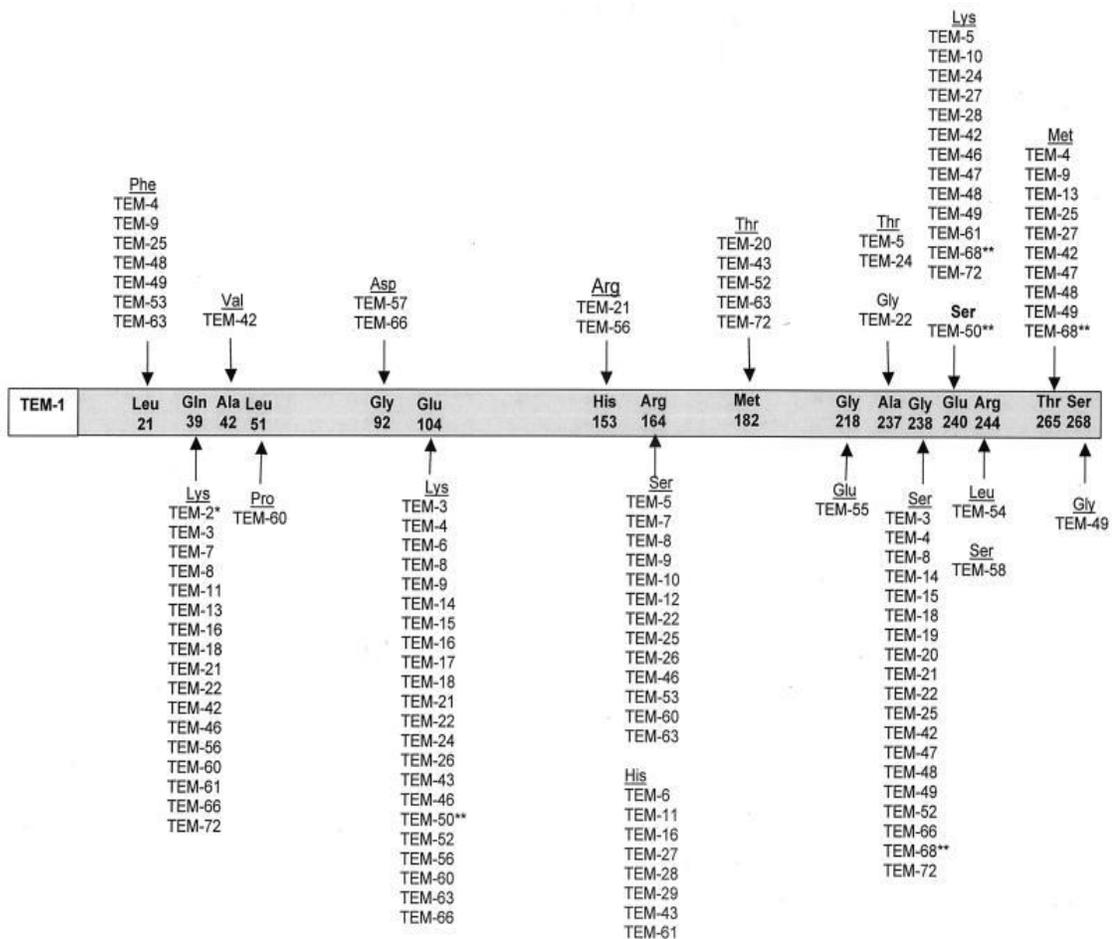
2.2.4.1 β -laktamase tipe TEM

TEM-1 adalah β -laktamase yang paling banyak ditemui pada bakteri gram-negatif. Hingga 90% resistensi ampisilin pada *Escherichia coli* disebabkan oleh produksi TEM-1 (Livermore D M. 1995). TEM-type β -lactumases paling sering ditemukan pada *E.coli* dan *K.pneumoniae*, mereka juga ditemukan pada spesies bakteri Gram-negatif lainnya dengan frekuensi yang semakin meningkat. Telah dilaporkan bahwa *ESBLs* tipe *TEM* yang terjadi secara alami adalah hasil dari tekanan selektif yang berfluktuasi dari beberapa beta-laktam dalam ruang tertentu dibandingkan dengan seleksi

dengan agen tunggal (Blazquez J, et. al 2000). Selanjutnya, ESBLs tipe TEM telah ditemukan pada bakteri gram negatif *non-Enterobacteriaceae*. TEM-42 beta-laktamase ditemukan pada strain *Pseudomonas aeruginosa* (Mugnier P, et al 1996). Selain itu, sebuah laporan baru-baru ini menemukan TEM-17 beta-laktamase diekspresikan dari plasmid dalam isolat kultur darah *Capnocytophaga ochracea* (Rosenau A, et. al 2000).

TEM-1 mampu menghidrolisis penisilin dan sefalosporin generasi awal seperti sefalotin dan sefaloridin. TEM-2, turunan pertama TEM-1, terjadi substitusi asam amino tunggal dari β -laktamase asli (Barth  l  my M,). Hal ini menyebabkan pergeseran titik isoelektrik dari pI 5,4 menjadi 5,6, namun hal itu tidak mengubah profil substrat. TEM-3, yang awalnya dilaporkan pada tahun 1989, adalah tipe pertama Beta-laktamase tipe TEM yang menunjukkan fenotip *ESBLs* (Sougakoff W, et. al 1988). Substitusi asam amino berperan atas gugus fenotipe *ESBLs* di sekitar tempat aktif enzim dan mengubah konfigurasinya, yang memungkinkan akses ke substrat oxyimino- β -laktam. Membuka situs aktif ke substrat β -laktam juga secara khas meningkatkan kerentanan enzim terhadap inhibitor β -laktamase, seperti asam klavulanat. Substitusi asam amino tunggal pada posisi 104, 164, 238, dan 240 menghasilkan *ESBL*. Phenotype, namun *ESBL* dengan spektrum terluas biasanya memiliki lebih dari satu substitusi asam amino tunggal. Pada tahun-tahun sejak laporan pertama tersebut, lebih dari 90 turunan TEM tambahan. Namun saat ini, berdasarkan kombinasi perubahan yang berbeda,

saat ini 140 enzim jenis TEM telah dijelaskan. TEM-10, TEM-12, dan TEM-26 termasuk yang paling umum di Amerika Serikat. S. (Thenmozhi, 2014) Beberapa dari β -laktamase ini adalah enzim yang resisten terhadap inhibitor, namun sebagian besar turunan baru adalah ESBL (Bradford P. A. 2001)



Skema 1. Substitusi asam amino pada turunan TEM ESBL. Asam amino yang tercantum di dalam bar abu-abu adalah yang ditemukan pada gen struktural TEM-1 β -lactamase (Sutcliffe J G, dkk 1978162). Penomoran asam amino sesuai dengan skema Ambler et al. (Ambler R P, dkk 19915). Substitusi yang ditemukan pada derivatif TEMBL tipe TEM ditunjukkan di bawah asam amino TEM-1. TEM-type varian mungkin mengandung lebih dari satu substitusi asam amino. *, TEM-2 bukan ESBL tapi termasuk dalam gambar sebagai turunan dari TEM-1. Substitusi Gln39Lys tidak berkontribusi pada fenotipe ESBL, namun sejumlah ESBL berasal dari TEM-2. ** TEM-50 dan TEM-68 mengandung substitusi asam amino yang umum

bagi ESBL dan fenotip IRT. Hanya substitusi asam amino yang umum ditemukan pada jenis TEM-jenis ESBL yang ditunjukkan pada gambar ini. (Bradford PA 2001)

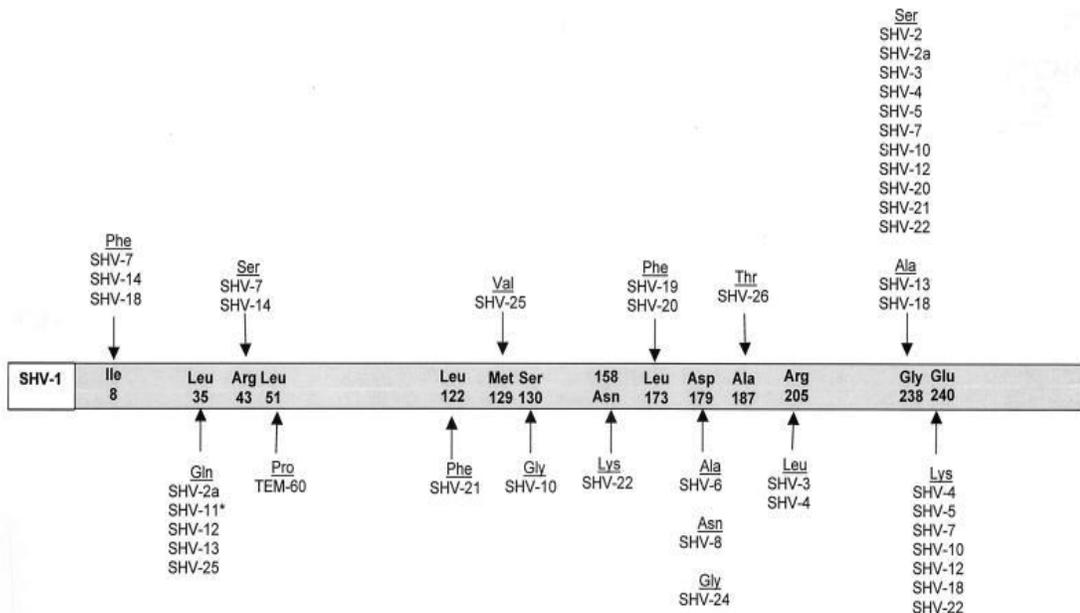
Seperti ditunjukkan pada Skema1, substitusi asam amino di dalam enzim TEM terjadi pada sejumlah posisi yang terbatas. Kombinasi perubahan asam amino ini menghasilkan berbagai perubahan halus pada fenotipe ESBL, seperti kemampuan untuk menghidrolisis oxyimino-sefalosporin spesifik seperti ceftazidime dan sefotaksim, atau perubahan pada titik isoelektriknya, yang berkisar dari pI 5,2 sampai 6.5 (Tabel.1). Sejumlah residu asam amino sangat penting untuk menghasilkan fenotipe ESBL saat substitusi terjadi pada posisi tersebut. Mereka termasuk glutamat pada lisin pada posisi 104, arginin terhadap serin atau histidin pada posisi 164, glisin hingga serin pada posisi 238, dan glutamat ke lisin pada posisi 240 (Gambar.1). Selain B-laktamase TEM-1 melalui TEM-92 yang ditunjukkan pada Gambar 11 dan Tabel 1, telah ada laporan enzim menyerupai tipe TEM yang terjadi secara alami, TEM-AQ, yang mengandung sejumlah substitusi asam amino dan satu delta asam amino yang belum pernah dicatat dalam enzim TEM lainnya (Perilli M, et. al 1997:127).

Tabel 4. Karakteristik β -laktamase tipe TEM

pI	Enzymes	Enzyme type		
		Broad spectrum	ESBL	IRT
5.2	TEM-12, TEM-55, TEM-57, TEM-58 TEM-30, TEM-31, TEM-35, TEM-36, TEM-37, TEM-38, TEM-41, TEM-45, TEM-51, TEM-73, TEM-74		X	X
5.3	TEM-25		X	
5.4	TEM-1 TEM-7, TEM-19, TEM-20, TEM-65 TEM-32, TEM-33, TEM-34, TEM-39, TEM-40, TEM-44	X	X	X
5.42	TEM-29		X	
5.55	TEM-5, TEM-17		X	
5.59	TEM-9		X	
5.6	TEM-2 TEM-10, TEM-11, TEM-13, TEM-26, TEM-63 TEM-50 TEM-59	X	X X X	X X X
5.7	TEM-68		X	
5.8	TEM-42		X	
5.9	TEM-4, TEM-6, TEM-8, TEM-27, TEM-72		X	
6.0	TEM-15, TEM-47, TEM-48, TEM-49, TEM-52, TEM-66, TEM-92		X	
6.1	TEM-28, TEM-43		X	
6.3	TEM-3, TEM-16, TEM-21, TEM-22		X	
6.4	TEM-56, TEM-60		X	
6.5	TEM-24, TEM-46, TEM-61		X	
Not determined	TEM-14, TEM-53, TEM-54 TEM-76, TEM-77, TEM-78, TEM-79, TEM-81, TEM-82, TEM-83, TEM-84		X	X

2.2.4.2 β -laktamase tipe SHV

SHV-1 membagikan 68 persen asam aminonya dengan TEM-1 dan memiliki struktur keseluruhan yang serupa. SHV-1 β -laktamase paling sering ditemukan di *K. pneumoniae* dan bertanggung jawab atas 20% resistensi ampisilin yang dimediasi oleh plasmid pada spesies ini (Tzouveleki, L. S., and R. A. Bonomo. 1999). Meskipun telah dihipotesiskan bahwa gen yang mengkodekan SHV-1 mungkin ada sebagai bagian dari elemen transposable, namun tidak pernah terbukti (Jacoby, G. A., and L. Sutton. 1991:75). ESBL dalam golongan ini juga memiliki perubahan asam amino di sekitar tempat aktif, paling sering pada posisi 238 atau 240. Lebih dari 60 varietas SHV diketahui. Mereka adalah tipe ESBL yang dominan di Eropa dan Amerika Serikat dan ditemukan di seluruh dunia. SHV-5 dan SHV-12 termasuk yang paling umum. (S. Thenmozhi, 2014)



Skema 2. Substitusi asam amino pada turunan ESBL tipe SHV. Asam amino yang tercantum di dalam bar abu-abu adalah yang ditemukan pada gen struktural dari *SHV-1 β-lactamase* (Bradford, P. A. 1999). Penomoran asam amino sesuai dengan skema Ambler et al. (Ambler, R. P., et al 1991). Substitusi yang ditemukan pada derivat ESBL tipe SHV terlihat pada asam amino SHV-1. Varietas tipe SHV mungkin mengandung lebih dari satu substitusi asam amino. *, SHV-11 bukan ESBL tapi termasuk dalam gambar sebagai turunan dari SHV-1.

Berbeda dengan betalaktamases tipe *TEM*, hanya ada sedikit turunan dari *SHV-1* (Tabel 2). Selanjutnya, perubahan yang telah diamati pada *blaSHV* untuk menghasilkan varian *SHV* terjadi pada posisi yang lebih sedikit di dalam struktural gen (Gambar 3). Mayoritas varian *SHV* yang memiliki fenotipe *ESBLs* ditandai dengan substitusi serin untuk glisin pada posisi 238. Sejumlah varian yang terkait dengan *SHV-5* juga memiliki substitusi lisin untuk glutamat pada posisi 240. Menarik bahwa keduanya Gly238Ser dan Glu240Lys substitusi asam amino mencerminkan yang terlihat pada jenis

TEM-ESBL. Residu serin pada posisi 238 sangat penting untuk efisiensi hidrolisis ceftazidime, dan residu lisin untuk hidrolisis sefotaksim (Huletsky, A., et. al 1993).

Tabel 5. Karakteristik β -laktamase tipe SHV

pI	Enzymes	Enzyme type		
		Broad spectrum	ESBL	Inhibitor resistant
7.0	OHIO-1, LEN-1 SHV-3, SHV-14	X	X	
7.5	SHV-24		X	
7.6	SHV-1, SHV-11 SHV-2, SHV-2a, SHV-6, SHV-8, SHV-13, SHV-19, SHV-20, SHV-21, SHV-22	X	X	
7.8	SHV-4, SHV-7 ^b , SHV-18		X	
8.2	SHV-5, SHV-9, SHV-12 SHV-10		X	X

Sampai saat ini, mayoritas turunan tipe SHV memiliki fenotip ESBL. Namun, satu varian, *SHV-10* dilaporkan memiliki fenotipe yang resistan terhadap inhibitor. Enzim ini tampaknya berasal dari SHV-5 dan mengandung satu tambahan substitusi asam amino glisin untuk serin 130 (Huletsky, A., et. al 1993). Sangat menarik bahwa fenotipe reseptor inhibitor yang diberikan oleh mutasi Ser140Gly tampaknya menggantikan fenotipe ESBL kuat yang biasanya terlihat pada enzim yang mengandung Gly238Ser dan mutasi Glu240Lys yang terlihat pada enzim tipe SHV-5 lainnya. Mayoritas ESBLs tipe SHV ditemukan pada strain *K. pneumoniae*. Namun, enzim ini juga ditemukan pada *Citrobacter diversus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (Bradford, P. A., et. al 1995; El Harrif-Heraud, Z., 1997; Naas, T., 1999; Rasheed, 1997).

2.2.4.3 β -laktamase tipe CTX-M

Enzim ini diberi nama berdasarkan pada kerjanya yang lebih dominan terhadap sefotaksim dibandingkan dengan substrat oxyimino- β -laktam lainnya (misalnya *Ceftazidime*, *ceftriaxone*, atau *cefepime*). Mereka timbul karena adanya mutasi yang merupakan contoh akuisisi gen plasmid β -laktamase yang biasanya ditemukan pada kromosom spesies *Kluyvera*, sekelompok organisme komensal yang jarang pathogen (Barthe'le'my, et. al 1992). Enzim ini tidak terkait erat dengan TEM atau SHV β -laktamases karena mereka hanya menunjukkan sekitar 40% kesaamaan. Lebih dari 80 enzim CTX-M saat ini diketahui (Tzouveleki, L. S., E. Tzelepi, P. T. Tassios, and N. J. Legakis. 2000). Sebelumnya, enzim yang kekerabatannya paling dekat di luar tipe ini dianggap sebagai kelas kromosom encoding A sefalosporinase yang ditemukan di *K. oxytoca*, *C. diversus*, *Proteus vulgaris*, dan *Serratia fonticola* (homologi 73 sampai 77%) (Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas. 1996 dan Bonnet, R., C. D. Champs, D. Sirot, C. Chanal, R. Labia, and J. Sirot. 1999). Namun, baru-baru ini dilaporkan oleh Humeniuk dkk. Bahwa ada tingkat homologi yang tinggi antara kromosom enzim AmpC dari *Kluyvera ascorbata* (tersusun Klu-1 dan Klu-2) dan enzim tipe CTX-M, menunjukkan bahwa secara original mungkin berasal dari spesies ini (G. Humeniuk, G Anti-infeksi, abstr. 20 / C4, 2000) Studi filogenetik keluarga laktamase tipe CTX-M menunjukkan empat

Tipe utama: tipe CTX-M-1 termasuk CTX-M-1 dan CTX-M-3; Tipe CTX-M-2, termasuk CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, dan Toho-1; Toho-2; dan CTX-M-8, dua kelompok terakhir yang hanya berisi satu anggota sampai saat ini (Bonnet, et al 2000). Jarak evolusioner antara masing-masing kelompok ini menunjukkan adanya perbedaan awal dari nenek moyang yang sama (Bonnet, R., 2000). Mereka terutama ditemukan pada strain *Salmonella enterica serovar Typhimurium* dan *E. coli*, namun juga telah ditemukan pada spesies *Enterobacteriaceae* lainnya dan merupakan jenis ESBL yang dominan di beberapa Negara di bagian Amerika Selatan dan di Eropa Timur. Mereka termasuk enzim tipe CTX-M yaitu CTX-M-1 (sebelumnya disebut MEN-1), CTX-M-2 hingga CTX-M-10 (Barthe´le´my, et. al 1992.& ; A. Oliver et. al, 2000,) juga Sebagai enzim Toho 1 dan 2 (Ishii, et. al 1995 & Ma, L., et. al 1998). CTX-M-14, CTX-M-3, dan CTX-M-2 adalah jenis paling luas. Saat ini CTX-M-15 pada *E. coli* adalah jenis yang prevalensinya paling banyak tersebar di masyarakat Inggris. (S. Thenmozhi, 2014)

Tabel 6. Karakteristik β -laktamase tipe CTX-M

β -Lactamase	Alternative name	pI	Country of origin	Bacterial species
CTX-M-1	MEN-1	8.9	Germany, Italy	<i>E. coli</i>
CTX-M-2		7.9	Argentina	<i>S. enterica</i> ^a
CTX-M-3	CTX-M-3	8.4	Poland	<i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i>
CTX-M-4		8.4	Russia	<i>S. enterica</i>
CTX-M-5		8.8	Latvia	<i>S. enterica</i>
CTX-M-6	CTX-M-5	8.4	Greece	<i>S. enterica</i>
CTX-M-7		8.4	Greece	<i>S. enterica</i>
CTX-M-8		7.6	Brazil	<i>P. mirabilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>C. amalonaticus</i>
CTX-M-9		8.0	Spain	<i>E. coli</i>
CTX-M-10		8.1	Spain	<i>E. coli</i>
Toho-1		7.8	Japan	<i>E. coli</i>
Toho-2		7.7	Japan	<i>E. coli</i>

^a All strains of *S. enterica* were serovar Typhimurium.

^b A. Oliver, J. C. Pérez-Díaz, T. M. Coque, F. Baquero, and R. Cantón, 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1480, 2000.

Studi kinetik telah menunjukkan bahwa beta-laktamases tipe CTX-M- menghidrolisis sefalotin atau sefaloridin lebih baik daripada benzilpenisilin dan mereka secara khusus menghidrolisis sefotaksim melebihi kemampuan menghidrolisis ceftazidime (Bradford, P. A., et. al 1998 & Tzouveleki, L. S., et. al 2000). Meskipun ada beberapa ceftazidime dapat dihidrolisis oleh enzim ini, biasanya memberikan resistensi yang tidak signifikan secara klinis. Telah ditunjukkan bahwa residu serin pada posisi 237, yang hadir dalam semua enzim CTX-M, memainkan peran penting dalam aktivitas spektrum luas dari taktamase tipe CTX-M (Tzouveleki, L. S., et. al 2000). Meskipun telah terbukti tidak penting, residu Arg-276 terletak pada posisi yang setara dengan Arg-244 pada tipe TEMBL atau tipe SHV, sebagaimana yang ditunjukkan oleh model molekuler, dan kemungkinan juga berperan dalam menghidrolisis oxyiminocephalosporins. (Gazouli, M., et. al 1998). Data kristalografi terkini untuk enzim Toho-1 menunjukkan bahwa ada peningkatan fleksibilitas dari interaksi 3 untai dan loop enzim ini dibandingkan dengan kelas A -laktamase lainnya. Lebih jauh lagi, kurangnya ikatan hidrogen di sekitar lingkaran bisa menjelaskan fenotip spektrum luas (Ibuka, A., et. al 1999). Selain hidrolisis cepat sefotaksim, ciri unik lain dari enzim ini adalah penghambatnya lebih baik oleh tazobaktam inhibitorase-laktamase daripada sulbaktam dan klavulanat (Bradford, P. A., et. al 1998; Ma, L., et. al 1998, Sabate, M., R. 2000; . Tzouveleki, L. S., et. al 2000). Strains yang mengekspresikan *CTX-M-type -lactamases* telah diisolasi dari banyak

belahan dunia, namun paling sering dikaitkan dengan fokal wabah di Eropa timur (Bradford, P. A., et. al 1998, Gazouli, M.,et. al 1998, Gniadkowski, M., et. al 1998), Amerika Selatan, dan Jepang (. Ma, L.,et. al, 1998.). Ada beberapa laporan tentang enzim ini pada isolat dari pasien di Eropa barat, kebanyakan diisolasi dari imigran dari daerah wabah (. Tzouvelekis, L. S. et al, 1998). Namun, Sabete' et al. Baru-baru ini melaporkan bahwa 23 strain *E. coli* dan *Salmonella* yang diisolasi di Spanyol mengekspresikan CTXM-9-laktamase, menunjukkan bahwa mungkin ada fokus endemik enzim ini di Eropa barat (Sabate', M., et. al 2000). Selain itu, strain *Enterobacter cloacae* CTX-M-3 baru-baru ini diisolasi di Perancis (Doucet-Populaire, F., et. al 2000). Beberapa institusi di daerah di mana wabah telah terjadi melaporkan bahwa enzim tipe CTX-M adalah *ESBL* yang paling sering diisolasi di antara isolat klinis di laboratorium mereka (Sabate', M. et al, 2000)

2.3 PCR (*Polymeration Chain Reaction*)

Penggandaan (amplifikasi) DNA secara cepat dapat dilakukan menggunakan metode PCR. Teknik ini didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA spesifik dimana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. Proses PCR dapat mengamplifikasi DNA target antara 10^6 - 10^9 kali. Proses PCR untuk mengamplifikasi DNA membutuhkan DNA cetakan yang mengandung urutan DNA target yang akan diamplifikasi, sepasang primer, enzim DNA

polimerase, buffer, dan campuran monomer nukleosida trifosfat (dNTP) (Abdullah dan Debbie, 2003).

Prinsip kerja PCR yaitu satu molekul DNA digunakan sebagai cetakan untuk menghasilkan dua salinan, empat, delapan dan sebagainya. Penggandaan berlangsung dibantu oleh protein spesifik yang dikenal sebagai DNA polimerase. DNA polymerase akan bekerja memperpanjang untaian DNA yang tersusun atas nukleotida yang terdiri dari empat basa adenin (A), timin (T), sitosin (C) dan guanin (G). Disamping itu, PCR juga membutuhkan fragmen DNA pendek yang dikenal sebagai primer yang berfungsi menyusun untaian DNA baru serta DNA cetakan. Jika ketiga bahan tersebut tersedia, maka pemanjangan DNA akan dilakukan oleh DNA polymerase (Joshi dan Deshpande, 2010).

Secara umum proses PCR terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi *template* pada suhu 94-96 °C, *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai tunggal DNA target pada suhu 40-60 °C dan *extension* (pemanjangan atau polimerisasi) pada suhu 72°C (Gambar 5). Berikut adalah tiga tahap utama kerja PCR dalam satu siklus:

1) Tahap denaturasi atau *melting*.

Tahap denaturasi berlangsung pada suhu tinggi 94–96°C, dalam proses ini ikatan hidrogen antara untaian DNA terputus (denaturasi) sehingga DNA utas ganda menjadi utas tunggal. Biasanya pada siklus awal PCR, tahap ini dilakukan kurang lebih (5 menit) untuk memastikan

semua untai ganda DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan DNA siap menjadi *template* (tempat menempelnya primer) (Yuwono, 2006).

2) Tahap penempelan atau *annealing*.

Primer menempel pada bagian *template* DNA yang mempunyai urutan basa komplementer. Penempelan ini bersifat spesifik. Tahap ini dilakukan pada suhu antara 40–60°C. Suhu yang tidak tepat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau primer menempel di tempat yang tidak tepat. Umumnya, waktu/durasi yang dibutuhkan untuk tahap ini yaitu selama 1–2 menit (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3) Tahap *ekstension*

Suhu untuk proses *ekstension* tergantung pada jenis enzim DNA polimerase yang dipakai. Tahap ini berlangsung pada kisaran suhu optimum kerja enzim DNA polimerase yaitu 70°C-76°C. Pada tahap ini DNA polimerase akan memasang dNTP yang sesuai pada pasangannya, jika basa pada *template* adalah A, maka akan dipasang dNTP, begitu seterusnya (pasangan A adalah T, dan C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim ini akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lamanya waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

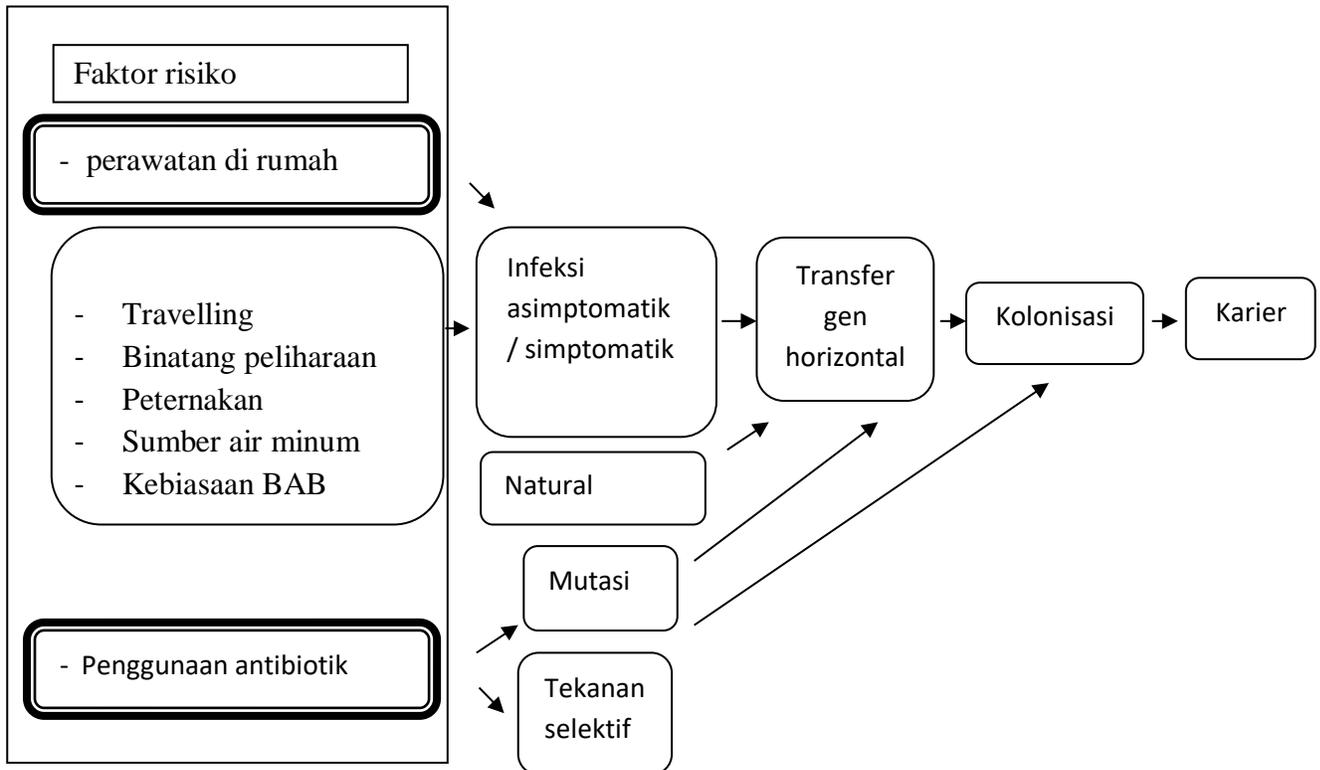
Analisis kualitatif DNA dilakukan dengan teknik elektroforesis. Metode elektroforesis merupakan teknik yang dapat digunakan untuk menggambarkan pergerakan molekul-molekul bermuatan dalam medan listrik

ke arah elektroda dengan muatan berlawanan atau teknik yang didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga di bawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan untuk elektroforesis adalah gel agarosa, polisakarida yang diekstraksi dari berbagai jenis ganggang merah, atau poliakrilamid yang mampu melakukan separasi DNA dengan kisaran ukuran yang luas. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 pasang basa dan dijalankan secara horizontal. Elektroforesis poliakrilamid dapat memisahkan 1 pasang basa dan dijalankan secara vertikal. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA (sekuensing) (Windiastika, 2012).

Cara kerja elektroforesis yaitu larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel agarosa dan diletakkan pada kutub negatif. Apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke kutub positif. Molekul DNA bermuatan negatif karena adanya gugus fosfat, sehingga molekul DNA akan bermigrasi ke elektroda positif (Gambar 6). Gel agarosa dengan tebal 0,5 cm akan memaksa DNA dengan ukuran 5 sampai 60 kb bergerak melewati celah kerangka agarosa yang membentuk pori-pori dengan ukuran tertentu sesuai dengan konsentrasi agarosa. Laju migrasi atau kecepatan pergerakan DNA dalam medan listrik berbanding terbalik

dengan massa DNA, tergantung dari muatan dan berat molekul DNA (Windiastika, 2012).

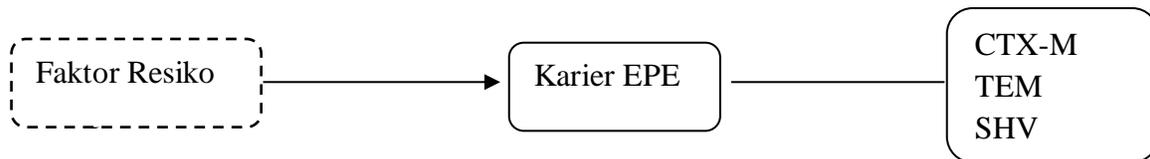
2.4 Kerangka Teori



Keterangan :

 Faktor pengendali

2.5 Kerangka Konsep



keterangan :



variabel dependen : karier EPE

Variabel independen : CTX-M, TEM, & SHV

2.6 Hipotesis

Adapun hipotesis pada penelitian ini

- Terdapat gen penghasil ESBL yang terdeteksi dari *Escherichia coli* dan Sampel feses
- Gen yang terdeteksi hasil ekstraksi secara langsung dari feses akan lebih banyak ditemukan dibandingkan dengan ekstraksi dari sel bakteri