

**IDENTIFIKASI GEN CTX M-3 DAN SHV-12 PADA ISOLAT
ENTEROBACTER CLOACAE DARI RUMAH SAKIT
PENDIDIKAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
DAN RUMAH SAKIT UMUM PUSAT
DR. WAHIDIN SUDIROHUSODO
MAKASSAR**

*IDENTIFICATION OF CTX M-3 AND SHV-12 GENES IN
ENTEROBACTER CLOACAE BACTERIA COLLECTION
OF HASANUDDIN UNIVERSITY TEACHING HOSPITAL
AND THE CENTRAL PUBLIC HOSPITAL DR. WAHIDIN
SUDIROHUSODO IN MAKASSAR*

DONNARIES HANGGA KUSUMA

C195181001



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**IDENTIFIKASI GEN CTX M-3 DAN SHV-12 PADA ISOLAT
ENTEROBACTER CLOACAE DARI RUMAH SAKIT
PENDIDIKAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
DAN RUMAH SAKIT UMUM PUSAT
DR. WAHIDIN SUDIROHUSODO
MAKASSAR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Dokter Spesialis
Mikrobiologi Klinik

Program Studi
Mikrobiologi Klinik

Disusun dan diajukan oleh

DONNARIES HANGGA KUSUMA

kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS
IDENTIFIKASI GEN CTX M-3 DAN SHV-12
PADA ISOLAT *Enterobacter cloacae* DARI
RUMAH SAKIT PENDIDIKAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
DAN RUMAH SAKIT UMUM PUSAT
DR. WAHIDIN SUDIROHUSODO
MAKASSAR

Disusun dan diajukan oleh

Donnaries Hangga Kusuma
C195181001

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 6 Agustus 2021 Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui:

Pembimbing



dr. Yoeke Dewi Rasita, M.Med.Klin, Sp.MK
NIP. 198203012009122004

Pembimbing Pendamping



dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D, Sp.MK
NIP. 196909181996032001

Ketua Program Studi



Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
NIP. 195704161985031001

Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd
NIP. 196612311995931009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Donnaries Hangga Kusuma

Nomor Pokok : C195181001

Program Studi : Mikrobiologi Klinik

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya tulis saya sendiri, dan bukan merupakan pemikiran orang lain. Apabila di waktu yang akan datang terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini merupakan hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 3 Agustus 2021

Yang menyatakan,

A handwritten signature in black ink is written over a yellow 2000 Rupiah postage stamp. The stamp features a portrait of a man and the text 'SEWU RUPIAH', '2000', and 'METERAI TEMPEL'. The serial number 'E93AJX569625700' is visible at the bottom of the stamp.

Donnaries Hangga Kusuma

PRAKATA

Penulis sampaikan puji syukur terhadap Tuhan Yang Maha Esa dengan dapat diselesaikannya tesis ini.

Ide yang mendasari permasalahan ini muncul akibat keresahan penulis terhadap salah satu bakteri patogen yang sering menyebabkan infeksi nosokomial dan resistansi antibiotik yang mengkhawatirkan. Penulis belum melihat ada studi yang dilakukan terhadap bakteri tersebut, khususnya di RSP Universitas Hasanuddin dan RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. Penulis menyoroti gen penyandi bakteri tersebut yang dapat menimbulkan terjadinya resistansi antibiotik. Terapi antibiotik yang diberikan terhadap bakteri itu harus tepat sesuai dengan hasil *susceptible* dan referensi literatur yang ada, sehingga tidak menimbulkan atau mencetuskan terjadinya resistansi antibiotik.

Banyak tantangan yang dihadapi oleh penulis saat menyusun tesis ini, yang oleh berkat bantuan dari berbagai pihak, maka tesis ini selesai tepat pada waktunya. Penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph. D., Sp.M.K.(K)., selaku Ketua Program Studi Mikrobiologi Klinik. Penulis mengucapkan terima kasih kepada dr. Yoeke Dewi Rasita, M. Med.Klin., Sp.M.K., sebagai dosen pembimbing, dan dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph. D., Sp.M.K., sebagai dosen pembimbing pendamping. Penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. dr.

Mochammad Hatta, Ph. D., Sp.M.K.(K)., Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph. D., Sp.M.K., dr. Baedah Madjid, Sp.M.K., Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, M. K.M., dr. Satriawan Abadi, Sp.P.D., K.I.C., selaku tim penguji. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada istri tercinta dr. Lilik Handayani yang sangat mendukung terselesaikannya tesis ini. Penulis sampaikan terima kasih kepada orang tua yang memberikan dukungan tiada henti untuk menyelesaikan tesis ini. Terima kasih penulis sampaikan kepada tim pembimbing dan penguji tesis yang telah banyak membantu. Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada mereka yang namanya tidak tercantum namun sangat banyak membantu penulis menyelesaikan tesis ini.

Makassar, 3 Agustus 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Donnaries Hangga Kusuma', with a long horizontal line extending from the bottom of the signature.

Donnaries Hangga Kusuma

ABSTRAK

DONNARIES HANGGA KUSUMA. *Identifikasi Gen CTX M-3 dan SHV-12 pada Isolat *Enterobacter cloacae* dari Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin dan Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar (Dibimbing oleh Yoeke Dewi Rasita dan Rizalinda Sjahril).*

Enterobacter cloacae merupakan salah satu spesies bakteri penyebab tersering *Hospital Acquired Infection* (HAI) yang dikenal resisten terhadap antimikroba. Gen *Cefotaxime Munich* (CTX) M-3 dan *Sulphydryl Variable* (SHV)-12 menyandi sifat resistensi terhadap antibiotik *Beta-lactam* dan menjadi penyebab *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL). Meskipun gen-gen tersebut telah diisolasi di kawasan Asia, namun sejauh ini sangat sedikit informasi yang menunjukkan prevalensi gen CTX M-3 dan SHV- 12 pada isolat *E. cloacae* di Indonesia khususnya di Makassar.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat distribusi *E. cloacae* berdasarkan keberadaan gen CTX M-3 dan SHV-12 pada isolat pasien yang dirawat di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin dan Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar menggunakan rancangan penelitian *cross-sectional*. Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang melaporkan tentang prevalensi resistansi berdasarkan deteksi gen CTX M-3 dan SHV- 12 pada isolat *E. cloacae*.

Penelitian ini menemukan sebanyak 18,1% (8/44) isolat positif untuk gen SHV-12, dan sebanyak 38.6% (17/44) positif untuk gen CTX M-3. Sedangkan jumlah isolat yang positif untuk kedua gen di atas sebanyak 6.8% (3/44).

Hasil identifikasi molekuler ini memperlihatkan adanya resistansi antimikroba oleh karena produksi ESBL pada *Enterobacter cloacae* yang berpotensi menyebabkan masalah dalam penanganan infeksi.

Kata Kunci: *Enterobacter cloacae*, Resistensi, CTX M-3, SHV-12, PCR

ABSTRACT

DONNARIES HANGGA KUSUMA. *Identification of CTX M-3 and SHV-12 gene in Enterobacter cloacae isolate of Hasanuddin University Teaching Hospital and the Centre General Hospital of DR. Wahidin Sudirohusodo Makassar* (Supervised by Yoeke Dewi Rasita dan Rizalinda Sjahril).

Enterobacter cloacae is one of the bacteria species which became the most frequent cause of *Hospital Acquired Infection* (HAI) that are suspected to cause resistance to some antibiotics. *Cefotaxime* (CTX) M-3 Gene and *Sulfhydryl Variable* (SHV)-12 gene encoding resistance antibiotics class A *Beta lactamase* and causing *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL). Though, the genes have been isolated around Asia region, however there is still little information on the rate of prevalence CTX M-3 gene and SHV-12 gene on *Enterobacter cloacae* in Indonesia particularly at Makassar.

This study aims to look at the distribution of *Enterobacter cloacae* based on the presence of CTX M-3 and SHV-12 genes on isolates of patients treated at the Hasanuddin University Teaching Hospital and Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar which method used in this study is *cross sectional*. This study was the first report on the resistance prevalence based on gene detection CTX M-3 and SHV-12 gene on *E. cloacae* isolate.

The results of this study concluded that SHV-12 gene found positive for (8/44) 18.1% isolates. CTX M-3 gene found positive for (17/44) 38.6% isolates. Positive CTX M-3 and SHV-12 gene were found as many as (3/44) 6.8% isolates.

The results of this molecular identification reveal antimicrobial resistance because of the production of ESBL on *E. cloacae* which is potentially responsible for infection control.

Keyword: CTX M-3, SHV-12, *Enterobacter cloacae*, Resistance, PCR

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN TESIS	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	3
a. Pertanyaan penelitian.....	4
b. Tujuan penelitian	5
c. Manfaat penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Tinjauan Umum tentang Bakteri <i>E. cloacae</i>	8
a. Karakteristik bakteri <i>E. cloacae</i>	8
b. Diagnosis laboratorium <i>E. cloacae</i>	9

c. Infeksi <i>E. cloacae</i>	12
1) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> pada infeksi saluran kemih.....	12
2) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> pada infeksi saluran pernapasan bawah	13
3) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> pada infeksi kulit.....	16
4) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> pada infeksi sistem saraf pusat	18
5) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> pada infeksi abdomen	20
6) Tinjauan umum <i>E. cloacae</i> penyebab sepsis	21
B. Tinjauan Umum tentang Resistansi pada Bakteri	24
C. Tinjauan Umum tentang Klasifikasi Ambler <i>Beta lactamase</i>	25
1) Resistansi <i>Beta lactamase</i>	28
2) Gen CTX M-3.....	29
3) Gen SHV-12.....	31
D. Tinjauan Umum tentang PCR.....	32
E. Kerangka Teori.....	43
F. Definisi Operasional	44
BAB III METODE PENELITIAN.....	46
A. Metode dan Rancangan Penelitian	46
B. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	46
C. Populasi dan Subjek Penelitian	47
D. Kriteria Subjek Penelitian.....	48
E. Teknik Sampling	48
F. Kerangka Konseptual	50

G. Alat Pemeriksaan	52
H. Bahan Pemeriksaan	52
I. Alur Penelitian	53
J. Prosedur Kerja.....	54
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN	60
A. Hasil Penelitian.....	61
B. Pembahasan	72
BAB V PENUTUP	80
A. Kesimpulan.....	80
B. Saran.....	82
DAFTAR PUSTAKA.....	84
LAMPIRAN	91
ETIKA PENELITIAN.....	115

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
Tabel 1 Distribusi <i>E. cloacae</i> berdasar temuan gen SHV-12	60
Tabel 2 Distribusi <i>E. cloacae</i> berdasar temuan gen CTX M-3	61
Tabel 3 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen SHV-12 positif berdasar lokasi ruangan rawat inap penderita	61
Tabel 4 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen CTX M-3 positif berdasar lokasi ruangan rawat inap penderita	62
Tabel 5 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen SHV-12 positif berdasar resistansi terhadap beberapa jenis antibiotik	63
Tabel 6 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen CTX M-3 positif berdasar resistansi terhadap beberapa jenis antibiotik	64-65
Tabel 7 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen SHV-12 positif berdasar lama rawat inap	66
Tabel 8 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen CTX M-3 positif berdasar lama rawat inap	66
Tabel 9 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen SHV-12 positif, gen CTX M-3 positif, gen SHV-12 positif, dan gen CTX M-3 positif berdasar diagnosis klinis	67
Tabel 10 Distribusi <i>E. cloacae</i> gen SHV-12 positif, gen CTX M-3 positif, gen SHV-12 positif dan gen CTX M-3 positif berdasar jenis spesimen	68

DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
Gambar 1. Kerangka Teori	43
Gambar 2. Kerangka Konseptual	50
Gambar 3. Alur Penelitian	53

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
Lampiran 1. Hasil elektroforesis	91
Lampiran 2. Dokumentasi penelitian	94
Lampiran 3. Hasil identifikasi <i>E. cloacae</i> secara <i>fenotip</i> dan <i>genotip</i>	96
Lampiran 4. Hasil identifikasi <i>E. cloacae</i> pada <i>MacConkey</i> agar, TSI agar, dan SIM agar	103
Lampiran 5. Hasil <i>sequensing</i> gen CTX M-3 dan gen SHV-12	111

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Genus *Enterobacter* merupakan salah satu bakteri dari Grup *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacter* spp.). Grup *ESKAPE* merupakan penyebab tersering *Hospital Acquired Infection (HAI)* yang resisten terhadap antimikroba. *Multi Drug Resisten (MDR) E. cloacae* telah menyebar dan menjadi salah satu strain *E. cloacae* yang sulit untuk diterapi. *MDR E. cloacae* yang dimaksud seperti *Beta lactamase* dan *Carbapenemase Resisten E. cloacae (CREC)* (Davin, Regli, et. al., 2019).

Annavajhala, et. al., (2019), melaporkan penyebaran *MDR E. cloacae* di Amerika Serikat sebanyak 7,2%. Poirel, et. al., (2011), melaporkan penyebaran *MDR E. cloacae* di Prancis sebanyak 501 isolat. Miltgen, et. al., (2018), melaporkan penyebaran *MDR E. cloacae* di Prancis sebanyak 11,76%. Jin, et. al., (2018), melaporkan penyebaran *MDR E. cloacae* di Cina sebanyak 68%. Teo JWP, et. al., (2013), melaporkan kasus sepsis yang disebabkan oleh *MDR E. cloacae* di Singapore. Pemahaman tersebut

dapat menjadi salah satu acuan bahwa sudah terjadi penyebaran MDR *E. cloacae* secara cepat di Asia Tenggara.

Isolat klinik yang *resisten* karena produksi *karbapenemase* telah teridentifikasi beberapa tahun terakhir ini (Jin, *et al.*, 2018). *Strain IMP, NDM, GIM*, atau *KPC* telah dideskripsikan di Asia. Hasil penelitian Lee, *et al.*, (2005), menemukan angka rata-rata *resisten* terhadap antibiotik *imipenem* pada *E. cloacae* sebesar 0,4%. Untuk antibiotik golongan *aminoglikosida*, persentase *strain* yang *resisten* dari 0%-51% pada gentamisin, dan sekitar 0%-34% untuk amikasin. Beberapa studi terakhir menunjukkan 77% *strain* di Cina merupakan *plasmid* positif yang *resisten* terhadap *aminoglikosida* (Huang, *et al.*, 2012). Hal yang menentukan *plasmid resiten* terhadap *fluoroquinolone* ditemukan lebih dari 60% *strain* (Kanamori *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan di tahun 2009-2010 di Unit Perawatan Intensif RS Fatmawati Jakarta diketahui bahwa *E. cloacae* masuk dalam jajaran 15 besar patogen penyebab tersering resistansi terhadap beberapa jenis antibiotik. *E. cloacae* diketahui merupakan penyebab ketiga infeksi nosokomial. (Dai, *et al.*, 2013; Lee, *et al.*, 2010; Radji, *et al.*, 2019; Jin, *et al.*, 2018).

Resistansi yang diperoleh beberapa spesies *E. cloacae* menekankan pentingnya identifikasi pada tingkat spesies secara molekuler. gen CTX M-3 dan SHV-12 menyandi resistansi antibiotik *Beta lactamase* Kelas A ESBL. Resistansi pada *cefepime* dapat berkaitan dengan adanya gen SHV 12. Gen SHV 12 merupakan salah satu prevalensi tipe SHV di

Asia. CTX M-3 dilaporkan pertama kali di Rumah Sakit Praski Polandia. Laporan kasus pasien di Prancis ditemukan *strain* yang menghasilkan CTX M-3 pada pasien tanpa ada riwayat perjalanan sebelumnya dari Polandia. Pemahaman tersebut dapat menjadi salah satu acuan bahwa MDR *E. cloacae* telah menyebar dengan cepat. Penelitian ini dilakukan untuk melihat distribusi gen CTX M-3 dan gen SHV-12 dari isolat *E. cloacae* di Rumah Sakit Umum Pusat Wahidin Sudirohusodo dan Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar. Tidak ditemukan studi di Indonesia yang membahas khusus gen penyandi resistansi antibiotik *Beta lactamase* pada *Enterobacter cloacae*, oleh karena itu penulis tertarik untuk meneliti mengenai gen-gen penyandi resistansi antibiotik *Beta lactamase* pada bakteri *E. cloacae*.

B. Rumusan Masalah

Dengan memperhatikan latar belakang masalah di atas, maka dapat dirumuskan masalah penelitian dalam bentuk rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah distribusi *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin berdasarkan keberadaan gen CTX M-3 dan gen SHV-12?

a. Pertanyaan penelitian

1. Bagaimanakah distribusi dan persentase *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin berdasarkan keberadaan gen CTX M-3?
2. Bagaimanakah distribusi dan persentase *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin berdasarkan keberadaan gen SHV-12?
3. Berapa jumlah temuan gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan lokasi ruangan rawat inap pasien?
4. Berapa jumlah temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan lokasi ruangan rawat inap pasien?
5. Bagaimana distribusi dan persentase gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis antibiotik yang *resisten*?
6. Bagaimanakah distribusi dan persentase temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis antibiotik yang *resisten*?
7. Berapa jumlah temuan gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan lama rawat inap pasien?
8. Berapa jumlah temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan lama rawat inap pasien?

9. Bagaimana distribusi dan persentase gen SHV-12, gen CTX M-3, dan gen SHV-12 dan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan diagnosis?
10. Bagaimanakah distribusi dan persentase gen SHV-12, gen CTX M-3, dan gen SHV-12 dan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis spesimen?

b. Tujuan penelitian

1. Tujuan umum

Melihat distribusi *E. cloacae* berdasarkan keberadaan gen CTX M-3 dan gen SHV-12.

2. Tujuan khusus

- 1) Untuk mengetahui distribusi *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin berdasarkan gen CTX M-3.
- 2) Untuk mengetahui distribusi *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin berdasarkan gen SHV-12.
- 3) Untuk mengetahui jumlah temuan gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan lokasi ruangan rawat inap pasien.

- 4) Untuk mengetahui jumlah temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan lokasi ruangan rawat inap pasien.
- 5) Untuk mengetahui distribusi dan persentase gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis antibiotik yang *resisten*.
- 6) Untuk mengetahui distribusi dan persentase temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis antibiotik yang *resisten*.
- 7) Untuk mengetahui jumlah temuan gen SHV-12 pada *E. cloacae* berdasarkan lama rawat inap pasien.
- 8) Untuk mengetahui jumlah temuan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan lama rawat inap pasien.
- 9) Untuk mengetahui distribusi dan persentase gen SHV-12, gen CTX M-3, dan gen SHV-12 dan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan diagnosis.
- 10) Untuk mengetahui distribusi dan persentase gen SHV-12, gen CTX M-3, dan gen SHV-12 dan gen CTX M-3 pada *E. cloacae* berdasarkan jenis spesimen.

c. Manfaat penelitian

1. Manfaat teoritis

- 1) Mendapat pengetahuan tentang komposisi genetik penentu resistansi antibiotik dari enzim *Beta lactamase* yang didapatkan pada isolat *E. cloacae*.

- 2) Mendapat pengetahuan tentang distribusi *genotip* CTX M-3 dan SHV-12 pada *E. cloacae* yang diisolasi dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
- 3) Mendapat pengetahuan tentang *E. cloacae* sebagai penyebab infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernapasan bawah, infeksi sistem saraf pusat, infeksi abdomen, sepsis, dan infeksi pada luka.

2. Manfaat aplikatif

- 1) Hasil penelitian tentang ditemukannya gen CTX M-3 dan SHV-12 pada isolat *E. cloacae* dapat digunakan sebagai salah satu referensi deteksi molekular.
- 2) Hasil penelitian dapat dipakai sebagai rujukan untuk penelitian selanjutnya tentang *E. cloacae*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum tentang Bakteri *E. cloacae*

a. Karakteristik bakteri *E. cloacae*

E. cloacae merupakan spesies dari Genus *Enterobacteriales*. Saat ini dibagi menjadi dua subspecies: *E. cloacae subsp. cloacae*, yang dicirikan tes eskulin negatif, dan *E. cloacae subsp. dissolvens*, yang dicirikan tes eskulin positif (Hoffmann, *et. al.*, 2005). *E. cloacae* memfermentasi sorbitol dan sukrosa. Bakteri *E. cloacae* merupakan jenis bakteri gram negatif yang juga memiliki faktor virulensi yang menjadi salah satu faktor risiko sulitnya mengatasi infeksi tersebut. Bakteri *E. cloacae* merupakan bakteri anaerob fakultatif gram negatif batang lurus, berukuran 0.6-1.0 x 2.0-3.0 μm , terlihat tunggal atau berkelompok. Beberapa faktor patogenisitas yang telah teridentifikasi yaitu sel sitotoksin membran hemolitik dan leukotoksik (Paraje, *et. al.*, 2005). Taksonomi bakteri *E. cloacae* sebagai berikut:

- 1) Kingdom: *Bacteria*
- 2) Phylum: *Proteobacteria*
- 3) Class: *Gamma Proteobacteria*
- 4) Ordo: *Enterobacterales*
- 5) Family: *Enterobacteriales*

6) Genus: *Enterobacter*

Kesimpulan yang bisa dipahami bahwa bakteri *E. cloacae* merupakan bakteri gram negatif batang lurus yang memiliki *resisten* alami terhadap beberapa jenis antibiotik seperti *ampicillin*, *amoxicillin clavulanate*, *cefoxitin* dan mempunyai faktor virulensi.

b. Diagnosis Laboratorium *E. cloacae*

1) Pemeriksaan mikroskopik *E. cloacae*

Bakteri gram negatif terlihat batang lurus pada pemeriksaan mikroskopik, berukuran 0.6-1.0 x 2.0-3.0 μm , terlihat tunggal, atau berkelompok.

2) Isolasi *E. cloacae*

Koloni berwarna *pink mukoid* terlihat pada isolasi bakteri *E. cloacae*.

3) Identifikasi biokimia pada *E. cloacae*

Medium *Triple Sugar Iron* (TSI) agar mengandung glukosa, sukrosa, laktosa, dan phenol red. Phenol red merupakan indikator pH. Warna berubah menjadi kuning pada *butt* ketika memfermentasi gula karena pH yang menurun. Isi dari TSI agar bertujuan untuk membedakan yang memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dengan yang tidak. Produksi gas dan H₂S dapat juga dilihat pada TSI agar. Daerah *slant*, *butt*, produksi gas, produksi H₂S yang dinilai pada TSI agar (Scott, *et. al.*, 2014).

Tabung TSI yang memperlihatkan *acid/acid* berarti memfermentasi laktosa, glukosa, dan, atau sukrosa, namun jika terlihat alkali/*acid* berarti memfermentasi glukosa dan tidak memfermentasi laktosa atau sukrosa. Apabila terlihat alkali/alkali berarti tidak ada fermentasi dari dekstrosa, laktosa, sukrosa. *Acid* terlihat sebagai warna kuning, sedangkan alkali sebagai warna merah. Produksi gas ditandai dengan adanya gelembung. Presipitat hitam yang muncul menandakan adanya produksi H₂S. Tes TSI agar yang dilakukan untuk mengidentifikasi *E. cloacae* terlihat *acid (slant)/acid (butt)*, dan alkali (*slant)/acid (butt)*. *Acid (slant)/acid (butt)* terlihat pada TSI agar saat identifikasi *Klebsiella pneumoniae*. *Acid/acid* dengan gas terlihat pada tes TSI agar saat identifikasi *E. cloacae* (de la Maza, et. al., 2020).

Tes *indol* merupakan bagian dari Tes Sulfur Indol Motilitas (SIM) agar yang termasuk salah satu uji/tes biokimia. Tes *indol* bertujuan untuk menyaring kemampuan organisme dalam mendegradasi asam amino *tryptofan* dan memproduksi *indol*. Hal tersebut dilakukan untuk mengenali anggota dari Ordo *Enterobacteriales*. *E. cloacae* tidak memproduksi *indol*. Bakteri dari Ordo *Enterobacteriales* lainnya yang tidak memproduksi *indol* yaitu seperti *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella spp.* Bakteri dari Ordo *Enterobacteriales* lainnya yang memproduksi *indol* seperti *Escherichia coli* dan *Vibrio cholera*. Prosedur yang dilakukan yaitu menginokulasikan koloni bakteri pada SIM agar. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 hingga 48 jam. Jika *indol* positif, maka akan terlihat cincin berwarna merah

setelah ditambahkan reagen Kovac's, namun apabila tidak memproduksi *indol*, maka akan terlihat warna kuning dan seperti cerah berawan (Doern, *et. al.*, 2018).

Tes SIM agar bisa digunakan untuk mengidentifikasi *E. cloacae*, dan tidak terdapat *indol* yang diproduksi. Namun lain halnya dengan *Escherichia coli* yang memproduksi *indol* pada tes SIM agar. Motilitas dapat terlihat pada tes SIM agar saat identifikasi *E. cloacae*. Motilitas tidak terlihat pada tes SIM agar saat identifikasi *Klebsiella pneumoniae* (Ryan, *et. al.*, 2018; Dai, *et. al.*, 2013; Mahon, *et. al.*, 2015).

c. Infeksi *E. cloacae*

1) Tinjauan umum *E. cloacae* pada infeksi saluran kemih

E. cloacae dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih. Beberapa studi melaporkan infeksi saluran kemih dan salah satunya dilaporkan oleh Akbari, *et. al.*, (2016), yang melakukan studi infeksi pada saluran kemih oleh karena *E. cloacae*. Tujuan dari studi yang dilakukan Akbari yaitu untuk menentukan hubungan antara *strain* secara filogenetik *E. cloacae complex* dan frekuensi infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *E. cloacae*.

Riset yang dilakukan Broomfield, *et. al.*, (2009), pada sampel urin didapatkan dari individu sehat yang digunakan untuk menunjukkan bahwa bakteri *E. cloacae* mampu memproduksi batu struvit pada urin karena memiliki kemampuan untuk memproduksi urease. Hal itu ditemukan bahwa

batu struvit yang dibentuk oleh semua isolat *E. cloacae* disebabkan karena memiliki kemampuan menghasilkan urease. Urease pada bakteri memiliki implikasi sebagai faktor yang memengaruhi pembentukan batu pada saluran urin dan ginjal. Pemahaman ini dapat mendukung dan menjadi pertimbangan dalam penanganan penyakit infeksi khususnya infeksi yang disebabkan oleh *E. cloacae* (Bunyan and Alkhuzae, *et. al.*, 2017).

E. cloacae telah teridentifikasi secara progresif sebagai 10 spesies terbanyak penyebab *hospital acquired infection* yang salah satu lokasi infeksi pada saluran kemih. Ada keterbatasan ilmu pengetahuan tentang korelasi antara filogenetik *strain* terkait dengan *E. cloacae* dan frekuensi penyakit yang disebabkan oleh *E. cloacae* yang merupakan suatu tantangan (Kremer and Hoffmann, 2012).

Menurut penelitian Janasuta, *et. al.*, (2019), diketahui bahwa penyebab infeksi saluran kemih berdasarkan spesies terbanyak adalah *E. cloacae* yaitu sebanyak 18 (90%). Pola *susceptible E. cloacae* terhadap antibiotik *susceptible* terhadap *amikacin* (88,9%) dan tidak *susceptible ampicillin* (94,4%). Rosana, *et. al.*, (2020), melaporkan bahwa sebanyak 5,3% ditemukan *E. cloacae* sebagai penyebab infeksi saluran kemih pada wanita hamil dari 8 puskesmas di Jakarta.

2) Tinjauan umum *E. cloacae* pada infeksi saluran pernapasan bawah

E. cloacae dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernapasan bawah. Beberapa studi melaporkan infeksi pada saluran pernapasan bawah oleh *E. cloacae*. Bakteri *E. cloacae* merupakan salah satu isolat patogen tersering dan meningkat signifikan sebagai patogen pada Unit Perawatan Intensif. Penelitian yang dilakukan di tahun 2009-2010 di Unit Perawatan Intensif RS Fatmawati Jakarta diketahui bahwa *E. cloacae* masuk dalam jajaran 15 besar patogen penyebab tersering resistansi terhadap beberapa jenis antibiotik. Pemahaman tersebut dapat menjadi pertimbangan dalam mengidentifikasi *E. cloacae* sebagai salah satu agen patogen penyebab infeksi nosokomial khususnya di Unit Perawatan Intensif. Lokasi infeksi tersering pada pasien yang dirawat di Unit Perawatan Intensif RS Fatmawati yaitu infeksi saluran pernapasan (78,7%). Ruang Unit Perawatan Intensif merupakan salah satu sumber potensi infeksi nosokomial. Potensi sumber infeksi nosokomial masih terjadi bahkan di negara yang sudah melaksanakan pencegahan pengendalian infeksi secara ketat. Banyak pasien di Unit Perawatan Intensif yang memperoleh infeksi yang berasal dari peralatan medis yang terpasang seperti kateter, dan ventilator mekanik. Pemahaman tersebut dapat menjadi pertimbangan dalam mengidentifikasi sumber infeksi yang salah satunya berasal dari peralatan medis yang terpasang (Shulman and Ost, 2005; Radji, *et. al.*, 2011).

E. cloacae merupakan patogen nosokomial yang timbul dari Unit Perawatan Intensif, terutama pada pasien yang menggunakan ventilator. *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP) merupakan infeksi pada parenkim paru yang merupakan komplikasi dari pemasangan ventilasi mekanik seperti ventilator selama lebih dari 48 jam. Penelitian Gao, *et. al.*, (2019), mendapatkan data bahwa *E. cloacae* merupakan agen patogen penyebab ketiga VAP tersering. *E. cloacae* merupakan agen patogen penyebab VAP tersering di bangsal paru. Lama perawatan lebih dari 7 hari di Unit Perawatan Intensif menjadi salah satu faktor risiko penting infeksi bakteri yang *resisten* terhadap beberapa jenis antibiotik. Durasi perawatan pasien di Unit Perawatan Intensif yang lama dapat memperbesar peluang untuk terjadinya infeksi nosokomial. Pemahaman tersebut dapat menjadi panduan dalam mencegah dan mengendalikan penyebaran infeksi bakteri yang *resisten* terhadap beberapa jenis antibiotik. Penelitian Mezzatesta, *et. al.*, (2012), melaporkan kasus *E. cloacae* yang didapat di Unit Perawatan Intensif terutama pada *pneumonia* yang telah komplikasi. *Ceftazidime* atau *piperacillin tazobactam* biasanya digunakan sebagai terapi empirik dalam mengobati kasus *pneumonia* yang didapat pada Unit Perawatan Intensif.

Peningkatan prevalensi ESBL yang dihasilkan oleh *E. cloacae* telah menjadi perhatian, bukan hanya sebagai terapi infeksi dan terapi empirik, namun juga sebagai kontrol program infeksi. Pemahaman tersebut dapat menjadi panduan tim pencegahan pengendalian infeksi dalam merancang program kerja. Kasus ini juga menginfokan mengenai pentingnya pemilihan

terapi empirik antibiotik yang tepat dalam menangani *pneumonia* yang telah mengalami komplikasi di Unit Perawatan Intensif. Pemilihan terapi antibiotik yang tepat dapat mencegah komplikasi (Manzur, *et. al.*, 2007).

Ceftazidime atau *piperacillin tazobactam* bukan selalu merupakan terapi antimikroba yang tepat pada *pneumonia* nekrosis komplikasi yang disebabkan oleh *E. cloacae* walaupun antibiotik tersebut biasanya digunakan sebagai terapi empirik dalam menangani *pneumonia* yang didapat pada Unit Perawatan Intensif. *Strain E. cloacae* yang memiliki kromosom mengodekan *ampC Beta lactamase* dapat berkembang menjadi *resisten* terhadap *sefalosporin* spektrum luas. *Strain E. cloacae* dengan ESBL mengalami peningkatan penyebaran pada seluruh dunia, dan munculnya *resisten* yang lebih besar terhadap *karbapenem* telah menjadi perhatian dunia (Jacoby, *et. al.*, 2004; Yang, *et. al.*, 2012; Lee, *et. al.*, 2005).

Pasien dengan status *imunokompromise* merupakan salah satu penyebab utama dari kematian. Terapi *karbapenem* secara segera pada pasien dengan status *imunokompromise* dapat menjadikan terapi yang tepat, sehingga dengan demikian menurunkan angka mortalitas. Terapi *karbapenem* seharusnya diberikan segera pada pasien *pneumonia* yang didapat pada Unit Perawatan Intensif hingga hasil uji antibiotik terkonfirmasi. Bakteri *E. cloacae* diketahui memiliki beberapa faktor virulensi. Salah satu faktor virulensi *E. cloacae* yaitu *enterotoksin*, α *hemolisin*, dan *thiol* yang mengaktivasi sitotoksin *panton valentine leucocidin* yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus*, yang

menyebabkan destruksi leukosit dan nekrosis jaringan. Patogenesis potensial yang berpotensi komplikasi menjadi *pneumonia* nekrosis berkaitan dengan sitotoksin yang membentuk lubang kulit yang diproduksi oleh *E. cloacae* (Chou, *et. al.*, 2018).

3) Tinjauan umum *E. cloacae* pada infeksi kulit

E. cloacae dapat menyebabkan infeksi pada kulit. Beberapa studi melaporkan infeksi pada kulit oleh *E. cloacae*. Riset yang dilakukan oleh Chen Lin, *et. al.*, (2013), pada pasien *selulitis* di Taiwan, didapatkan data bahwa *E. cloacae* menjadi agen patogen penyebab *selulitis* sebanyak 22%. *Selulitis* yang terjadi diteliti pada pasien-pasien yang terkena banjir akibat badai di Taiwan. Studi pada air di kota besar menemukan bahwa air yang tidak steril terjadi karena air tersebut sudah tercemar dengan bakteri dari kelompok *Enterobacteriales*. *Selulitis* yang terjadi berhubungan dengan air yang tercemar tersebut. Pemahaman tersebut dapat menjadi panduan dalam penanganan dan pencegahan infeksi pada kulit (Ki and Rotstein, 2008).

Dyachenko, *et. al.*, (2005), melaporkan kasus *selulitis bulla hemorhagik* yang disebabkan oleh *E. cloacae* pada pria dewasa. Pasien dapat dikategorikan dalam kondisi sehat dan berada dalam status *imunokompeten*. Kasus yang dilaporkan ini merupakan kasus yang tidak biasa. Pasien dengan status *imunokompeten* bukan merupakan salah satu faktor risiko untuk mudah terinfeksi oleh MDR *E. cloacae*. Pria berusia 45

tahun datang ke Departemen Dermatologi dengan didiagnosis *selulitis* tungkai kiri. Kombinasi pemeriksaan fisik yang ditemukan seperti demam, nyeri tungkai bawah, tampak gambaran *bulla hemorhagik multipel*. Pemeriksaan tungkai bawah kiri menunjukkan *flaccid multiple, bulla hemorhagik*, terlihat eritem dan edema. Hal tersebut dapat menjadi petunjuk bahwa terjadi proses *inflamasi*. Hasil pemeriksaan darah menunjukkan leukositosis (16.000/ul) dengan *shift to the left* dan laju endap darah 90 ml/jam. Hal tersebut dapat menjadi petunjuk bahwa terjadi peningkatan *marker* infeksi yang menandakan adanya proses infeksi. *Ultrasound Doppler* tidak menunjukkan *deep vein thrombosis* pada saat itu dan pada radiografi tidak menunjukkan kelainan tulang. Tungkai bawah kiri menunjukkan gambaran infiltrat kutan tanpa adanya pembentukan gas pada *Computed Tomografi*. Hasil kultur darah negatif, namun kultur swab dari *bulla hemorhagik* menunjukkan pertumbuhan bakteri *E. cloacae*. Pemahaman tersebut dapat menjadi petunjuk bahwa proses infeksi yang terjadi merupakan infeksi *primer* dan tidak menyebar ke seluruh tubuh yang pada akhirnya dapat menyebabkan terjadinya bakteremia sebagai proses infeksi sekunder. Organisme tersebut *susceptible* terhadap *gentamisin* dan *ciprofloxacin*.

Studi yang dilakukan Simi, *et. al.*, (2003), memberi informasi bahwa *E. cloacae* dapat mengontaminasi larutan steril di rumah sakit. Larutan steril di rumah sakit normalnya dapat terkontaminasi oleh mikroorganisme tersebut tanpa pencegahan maupun kewaspadaan yang tepat. *Hemolysin*

enterotoxigenic dari *E. cloacae* yang ditemukan menjadi faktor virulensi pada infeksi *E. cloacae*. Pemahaman tersebut dapat menjadi pertimbangan penanganan yang cukup sulit akibat infeksi *E. cloacae*.

Kesimpulan yang bisa dipahami bahwa *E. cloacae* dapat menyebabkan *selulitis*. *Selulitis* yang terjadi berhubungan dengan air di lingkungan yang tercemar. *E. cloacae* dapat mengontaminasi larutan steril di rumah sakit.

4) Tinjauan umum *E. cloacae* pada infeksi sistem saraf pusat

E. cloacae dapat menyebabkan infeksi pada sistem saraf pusat. Beberapa studi melaporkan infeksi pada sistem saraf pusat oleh *E. cloacae*. *Meningitis Enterobacter* merupakan *meningitis* bakteri yang jarang terjadi. *Meningitis Enterobacter* merupakan infeksi menantang yang berkaitan dengan konsekuensi serius. Huang, *et. al.*, (2012), mengidentifikasi 19 kasus infeksi selama 12 tahun, khususnya *neurotrauma* dan bedah saraf. *sefalosporin* generasi ketiga merupakan terapi bermakna untuk *meningitis* yang disebabkan oleh bakteri gram negatif, oleh karena aktivitas spektrum yang luas dan memiliki penetrasi sangat baik ke sistem saraf pusat. Pemahaman tersebut dapat menjadi pertimbangan dalam pemberian antibiotik pada infeksi otak. Telah diketahui insiden tinggi dari resistansi *E. cloacae* dan *Enterobacter aerogenes* terhadap antibiotik *sefalosporin* generasi ketiga. Hal ini merupakan suatu permasalahan dalam penanganan pasien. *Ceftizoxime* dan *ceftazidime* merupakan pilihan terapi empirik sekitar 70% dari pasien yang teridentifikasi. *Ceftizoxime* dan *ceftazidime*

kurang tepat penggunaannya pada infeksi sistem saraf pusat. Pemahaman tersebut dapat menjadi pengingat bahwa ada potensi bahaya *ampC Beta lactamase* yang distimulasi oleh pemberian *sefalosporin* generasi ketiga. *Trimethoprim-sulfamethoxazole* ditemukan bahwa merupakan antibiotik yang *susceptible* pada *meningitis* oleh *E. cloacae*. Hal tersebut dapat menjadi referensi dalam pemberian antibiotik pada infeksi otak.

Rousseau, *et. al.*, (2001), melakukan studi dan mendapatkan data bahwa pengobatan yang sukses terhadap *meningitis Enterobacter* dengan menggunakan *karbapenem*. Penelitian lainnya melaporkan angka sukses pengobatan *meningitis Enterobacter* dengan *cefepime*, *gentamisin intratekal/intrasisternal*, *imipenem plus amikasin intratekal*, *trimethoprim-sulfamethoxazole* dengan *gentamisin* dan *ciprofloxacin*. Pada studi Rousseau dapat disimpulkan bahwa gambaran *meningitis Enterobacter* merupakan komplikasi yang jarang. Penanganannya sering menimbulkan komplikasi dari *meningitis Enterobacter* yang *resisten* terhadap *sefalosporin* generasi ketiga. Pemahaman tersebut memberikan gambaran bahwa ada *ampC Beta lactamase* pada *E. cloacae* yang dilakukan stimulasi oleh pemberian *sefalosporin* generasi ketiga. Hasil penelitian Rousseau, *et. al.*, (2001), mengindikasikan bahwa *sefalosporin* generasi ketiga merupakan agen antibiotik yang tidak tepat dalam menangani *meningitis Enterobacter*. *Trimethoprim-sulfamethoxazole* memiliki hasil yang memuaskan.

5) Tinjauan umum *E. cloacae* pada infeksi abdomen

E. cloacae dapat menyebabkan infeksi pada abdomen. Beberapa studi melaporkan infeksi pada abdomen oleh *E. cloacae*. Bakteri *E. cloacae* bertanggung jawab terhadap 65-75% dari semua infeksi *Enterobacter*. Bakteremia merupakan sindrom terbanyak yang terjadi. Mayoritas infeksi merupakan infeksi nosokomial dan pasien dengan faktor predisposisi *E. cloacae* telah diakui sebagai agen patogen yang angka infeksiya meningkat beberapa tahun belakangan ini, dan memiliki implikasi sindrom klinik yang luas. Saluran cerna merupakan *reservoir endogen* pada *E. cloacae* dan penyebarannya dari saluran cerna sulit untuk ditemukan, sehingga dapat menjelaskan alasan tidak bisa teridentifikasi pintu masuk infeksiya. Pemahaman tersebut menjelaskan alasan penyebaran *strain E. cloacae* yang *resisten* terhadap beberapa jenis antibiotik. Mayoritas infeksi yang terjadi merupakan infeksi nosokomial. Pasien dengan *kolestitis* akut bakteremia akut dijumpai. Genus dari *Enterobacter* merupakan Ordo dari *Enterobacteriales*, ada 14 spesies dari genus *Enterobacter* yang telah dideskripsikan dan *E. cloacae* sebagai yang paling terbanyak menginfeksi manusia sebagai agen patogen (Lin YC., *et. al.*, 2006)

Isasti, *et. al.*, (2009), melakukan studi dan memperoleh data bahwa terdapat beberapa faktor risiko yang dapat meningkatkan terinfeksi oleh *E.*

cloacae. Pasien dengan peningkatan risiko karena infeksi *Enterobacter* termasuk pada pasien dengan riwayat rawat inap di rumah sakit yang lama, khususnya pada ruang Unit Perawatan Intensif. Insiden bakteremia meningkat signifikan sekitar 11% terjadi pada infeksi nosokomial. Perkembangan kondisi bakteremia oleh karena *E. cloacae* didukung karena penyakit *komorbid*, dan banyak faktor lainnya seperti diabetes melitus, penyakit keganasan, gagal ginjal kronik, penyakit saluran cerna. Pemahaman tersebut mendukung pernyataan bahwa pasien dengan status *imunokompromise* akibat penyakit *komorbid* menjadi salah satu faktor risiko terinfeksi *E. cloacae* (Isasti, *et.al.*, 2009)

6) Tinjauan umum *E. cloacae* penyebab sepsis

E. cloacae dapat menyebabkan bakteremia. Beberapa studi melaporkan bakteremia yang disebabkan oleh *E. cloacae*. Bakteri *E. cloacae* merupakan agen patogen nosokomial yang menyebabkan infeksi yang serius, termasuk bakteremia. *E. cloacae* penyebab bakteremia dapat terjadi salah satunya yaitu melalui peralatan medis yang terpasang di pasien. *Strain E. cloacae* yang salah satunya memiliki gen penyandi dari *kelas A Beta lactamase* atau ESBL menjadi salah satu perhatian dalam pemberian antibiotik yang tepat. Produksi ESBL pada *E. cloacae* belum begitu dapat dibuktikan (Qureshi, *et. al.*, 2011).

E. cloacae merupakan agen patogen penyebab infeksi nosokomial yang menyebabkan bakteremia. Resistansi terhadap *sefalosporin* sering

menyulitkan terapi infeksi yang diakibatkan oleh *E. cloacae*. Hal tersebut diduga bahwa penyakit infeksi yang diakibatkan oleh *strain E. cloacae* yang *resisten* menghasilkan tingginya angka mortalitas, lamanya rawat inap, meningkatnya biaya dibandingkan dengan infeksi yang diakibatkan oleh *strain E. cloacae* yang *susceptible* terhadap antibiotik. Data dari studi Kang, *et. al.*, (2004), menunjukkan bahwa mortalitas berkaitan dengan bakteremia akibat infeksi *E. cloacae* yang *resisten* terhadap *sefalosporin*. Pemahaman tersebut memberikan panduan mengenai pentingnya mencegah infeksi oleh *strain E. cloacae* yang *resisten* (Kang, *et. al.*, 2004).

Bakteremia yang disebabkan oleh infeksi *E. cloacae* berkaitan dengan beberapa faktor risiko. Alvarez- Marin, *et. al.*, (2021), melakukan studi dan mendapatkan data bahwa bakteremia yang disebabkan oleh *E. cloacae* berasal dari beberapa sumber. Sumber infeksi terbanyak berasal dari kateter vena sentral. Salah satu sumber infeksi lainnya berasal dari saluran cerna. Bakteremia yang disebabkan oleh *E. cloacae* dapat disebabkan oleh beberapa faktor risiko. Beberapa faktor risiko bakteremia yang disebabkan oleh *E. cloacae* yaitu pemasangan kateter vena sentral, hemodialisis kronik, riwayat terapi kortikosteroid sebelumnya, riwayat perawatan di Unit Perawatan Intensif, riwayat penyakit *komorbid*, dan riwayat terapi antibiotik sebelumnya. Faktor risiko tersering yang menyebabkan bakteremia yaitu pemasangan kateter vena sentral. Bakteremia yang disebabkan oleh *E. cloacae* karena pemasangan kateter yaitu sering terjadi pada pasien hemodialisis. Beberapa faktor risiko penting bakteremia yang disebabkan

oleh *E. cloacae* yaitu berkaitan dengan prosedur tindakan di rumah sakit (seperti pemasangan alat medis secara invasif, riwayat terapi antibiotik sebelumnya, durasi rawat inap di unit perawatan intensif). Pemahaman tersebut memberikan panduan mengenai penanganan bakteremia yang disebabkan oleh infeksi *E. cloacae* (Alvarez- Marin, *et. al.*, 2021).

Bakteremia yang disebabkan oleh infeksi *E. cloacae* berkaitan dengan angka mortalitas yang tinggi. Studi yang dilakukan Wang, *et. al.*, (2017), melakukan penelitian *retrospektif* untuk menyimpulkan *susceptible* dan hubungan *filogenetik E. cloacae* isolat darah pada dua tempat yaitu rumah sakit yang terafiliasi universitas di Shanghai. Penelitian tersebut bertujuan untuk mengatur infeksi *E. cloacae* dan menyoroti berbagai hal yang tidak diketahui dalam pencegahan di masa mendatang. *E. cloacae* merupakan patogen penting yang timbul dan menyebabkan beberapa jenis infeksi nosokomial termasuk infeksi saluran pernapasan, infeksi aliran darah, infeksi daerah operasi. Infeksi aliran darah yang disebabkan oleh karena MDR *Enterobacteriales* berkaitan dengan tingginya angka mortalitas, terkadang melampaui 50% tergantung pada populasi studi. Pemahaman tersebut menjadi panduan dalam menangani infeksi oleh *E. cloacae* secara komprehensif sehingga dapat mengurangi angka mortalitas. *E. cloacae* telah menjadi penyebab tersering ketiga dan spesies *Enterobacteriales* mematikan lebih dari satu dekade. Pernyataan tersebut bisa menjadi petunjuk dalam mengidentifikasi dan memberikan perhatian lebih pada penyakit infeksi oleh *E. cloacae*. Isolat MDR *E. cloacae* dilaporkan telah

menyebarkan dan membuat lebih mengkhawatirkan sehingga membuat penanganan serius terhadap terapi empirik. Penilaian studi yang dilakukan menunjukkan resistansi global terhadap *cefepime* meningkat signifikan dari 36% pada 2004 hingga 63% pada 2014 dan 8,5% dari *E. cloacae* yang merupakan MDR di Asia Pasifik, namun sedikit lebih rendah di Amerika latin (14%). Faktor yang dominan berkontribusi terhadap resistansi *E. cloacae* diduga mediasi *plasmid AmpC β lactamases*, Famili KPC dari *karbapenemase* dan *metallo β lactamase* dari VIM, IMP, NDM tipe 1 (Wang, *et. al.*, 2017; Alvarez- Marin, *et. al.*, 2021).

B. Tinjauan Umum tentang Resistansi pada Bakteri

Bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi terhadap beberapa antibiotik sehingga menimbulkan resistansi terhadap beberapa antibiotik yang diberikan. Resistansi bakteri dapat terbagi menjadi dua jenis yaitu resistansi intrinsik (resistansi secara alamiah) dan resistansi didapat. Resistansi intrinsik bergantung pada fisiologi dan struktur biokimia suatu bakteri. Resistansi didapat berkembang melalui beberapa cara seperti transformasi dari gen spesifik penyandi resistansi, faktor *bakteriofage*, *konjugasi*, *mutagenesis* pada gen bakteri itu sendiri (Giedraitiene, *et. al.*, 2011).

Antibiotik bekerja sebagai *ligan* pada target molekul spesifik dari agen patogen. Ikatan dari molekul antibiotik pada target spesifik yang dapat membunuh bakteri. Ada beberapa mekanisme resistansi bakteri terhadap

antibiotik. Beberapa mekanisme resistansi nya yaitu seperti memproduksi enzim yang menonaktifkan molekul antibiotik, modifikasi target yang dituju, mengubah target dari antibiotik, mengurangi permeabilitas sel, mengeluarkan kembali molekul antibiotik. Bakteri memproduksi enzim yang menonaktifkan molekul antibiotik dengan tujuan menghambat kerja antibiotik. Enzim yang diproduksi yaitu seperti ESBL. Gen CTX M-3 dan SHV-12 yang diteliti ini merupakan kelompok A *Beta lactamase* ESBL. Bakteri memodifikasi target yang dituju dengan cara mengubah sisi target yang dituju oleh molekul antibiotik sehingga tidak terbentuk ikatan. Bakteri mengubah target dari antibiotik dengan cara menyiapkan target substitusi yang dituju sehingga molekul antibiotik tidak bisa berikatan. Bakteri yang mengurangi permeabilitas sel dengan cara menghilangkan *porin* sehingga molekul antibiotik tidak dapat masuk dinding sel bakteri. Bakteri mengeluarkan kembali molekul antibiotik dengan cara melalui *porin*, sehingga molekul antibiotik tidak dapat berikatan dan menghancurkan bakteri (Arora, *et. al.*, 2017).

C. Tinjauan Umum tentang Klasifikasi Ambler *Beta lactamase*

Klasifikasi Ambler mengelompokkan *Beta lactamase* berdasarkan homologi *sequencing* asam amino. Klasifikasi Ambler mengelompokkan dari kelompok A hingga kelompok D. Klasifikasi Ambler penting untuk dipahami sehingga bertujuan untuk penanganan bakteri dengan *strain* terkonfirmasi

ESBL secara tepat dan komprehensif. Kelompok A *serine penicilinase Beta lactamase* sering dikode di *plasmid*, namun juga dapat terletak pada kromosom bakteri. Enzim kelompok A *serine penicilinase Beta lactamase* biasanya *susceptible* terhadap inaktivasi oleh *Beta lactamase* inhibitor seperti *clavulanate*, *sulbactam*, *tazobactam*, dan *avibactam*. Kasus pertama infeksi nosokomial oleh karena *strains* yang memiliki ESBL teridentifikasi pada 1989. Berbagai macam ESBL seperti TEM, SHV, CTX-M sejak saat itu terkarakterisasi pada *E. cloacae*, termasuk TEM. Gen SHV-12 dan CTX M-3 termasuk ke dalam kelompok A *serine penicilinase Beta lactamase* atau yang lebih dikenal dengan kelompok ESBL (Arpin, *et. al.*, 2002).

Kelas B *Metallo Beta lactamase* merupakan enzim bakteri yang mendegradasi cincin *Beta laktam* dengan bantuan kofaktor metal. Organisme penghasil *Metallo Beta lactamase* sering menunjukkan resistansi terhadap *penisilin*, *sefalosporin*, *karbapenem*, dan masih *susceptible* terhadap *Beta lactamase* inhibitor. Gen *Metallo Beta lactamase* berlokasi pada kromosom, *plasmid*, dan *integron*. Kelas C *Cephalosporinase Amp C Beta lactamase*, yang dikode oleh gen yang berlokasi pada kromosom bakteri, meskipun cukup sering *Amp C Beta lactamase* berlokasi pada *plasmid*. *E. cloacae* memiliki *Amp C Beta lactamase* walaupun tidak terkonfirmasi positif ESBL atau dari kelompok A *Beta lactamase*. Bakteri *E. cloacae* dengan *Amp C Beta lactamase* dapat dilakukan stimulasi kemunculannya apabila diberikan atau terpapar *sefalosporin* khususnya generasi ketiga. Bakteri yang mengekspresikan

Amp C Beta lactamase memperlihatkan sifat *resisten* terhadap penisilin, *Beta lactamase* inhibitor (seperti *clavulanate*, *sulbactam*, *tazobactam*, dan *avibactam*) dan banyak golongan *sefalosporin* termasuk *cefoxitin*, *cefotaxime*, *ceftriaxone*, *cefotetan* (Bonomo, 2017).

Amp C Beta lactamase merupakan kelas C dari klasifikasi Ambler, mengandung residu serina pada sisi aktif untuk dikatalisis. Mekanisme dari resistansi *Amp C Beta lactamase* terbagi menjadi tiga kategori. Kategori pertama yaitu resistansi yang dilakukan stimulasi melalui kromosom dengan mengodekan *Amp C* gen (seperti yang terdapat pada bakteri *E. cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan bakteri lainnya). Kategori kedua yaitu resistansi pada kromosom tanpa dilakukan stimulasi karena mutasi seperti yang terdapat pada bakteri *Escherichia coli*, *Shigella* spesies, *Acinetobacter baumannii*). Kategori ketiga yaitu resistansi yang dimediasi oleh *plasmid* (seperti yang terdapat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spesies, dan bakteri lainnya). Pemaparan terhadap antibiotik golongan *Beta laktam* dapat memicu terhadap suatu kejadian yang signifikan terhadap produksi *Amp C Beta lactamase*, bahkan terhadap infeksi yang disebabkan oleh isolat bakteri yang masih *susceptible*. Gen penghasil *Amp C Beta lactamase* yang dikode melalui kromosom dapat diidentifikasi pada beberapa organisme gram negatif, termasuk *E. cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, dan bakteri

lainnya. Beberapa akronim yang merepresentasikan organisme tersebut yaitu (seperti *ESPCM*, *SPICE*, *SPACE*, dan lainnya). Pola tanda *fenotipe* dari organisme tersebut yaitu bahwa mereka masih *susceptible* terhadap antibiotik *sefalosporin* generasi ketiga jika produksi *Amp C Beta lactamase* tidak dilakukan stimulasi, namun resistansi dapat terjadi jika pemaparan terhadap antibiotik *Beta laktam* terjadi dini setelah inisiasi pemberian antibiotik. Kelas D *serine Oxacillinases* dikategorikan sebagai *oxacillinases* karena kemampuannya menghidrolisis *oxacillin* sekitar 50%, namun hal tersebut sangat kontras dengan kelas A dan kelas C (Tamma, *et. al.*, 2019).

1) Resistansi *Beta lactamase*

Bakteri memiliki kemampuan beradaptasi terhadap antibiotik *Beta laktam* sehingga menimbulkan resistansi. Mekanisme resistansi terhadap antibiotik *Beta laktam* mencakup empat mekanisme. Mekanisme pertama yaitu perubahan pada lokasi dari Penicillin Binding Protein (PBP) yang dapat menurunkan afinitas dari antibiotik *Beta laktam* dan menyebabkan peningkatan resistansi terhadap agen patogen tersebut. Contohnya yaitu pada *Streptococcus pneumoniae*. Mekanisme kedua yaitu *channel* protein *porin* yang dimodifikasi sehingga tidak dapat diakses langsung oleh molekul antibiotik *Beta laktam* pada membran terluar dinding sel bakteri gram negatif. Mekanisme ketiga yaitu sistem pompa *efflux* yang dapat mengeluarkan kembali molekul antibiotik ke lingkungan luar bakteri sehingga tidak dapat bekerja pada titik lokasi di bakteri untuk mematikan

bakteri. Mekanisme keempat yaitu enzim *Beta lactamase* yang menghidrolisis cincin *Beta laktam* sehingga mengakibatkan terjadinya resistansi antibiotik golongan *Beta laktam*. Pemahaman resistansi terhadap antibiotik *Beta laktam* dapat menjadi pertimbangan dalam pemberian terapi antibiotik (Bush, 2010).

2) Gen CTX M-3

E. cloacae merupakan patogen penting yang menyebabkan beberapa jenis infeksi nosokomial termasuk infeksi saluran pernapasan, infeksi aliran darah, infeksi daerah operasi. Infeksi akibat *E. cloacae* perlu diperhatikan karena memiliki faktor virulensi dan terdapat beberapa *strain* yang sudah *resisten* terhadap beberapa jenis antibiotik sehingga membuat sulit penanganannya. Infeksi aliran darah yang disebabkan oleh karena MDR *Enterobacteriales* berkaitan dengan tingginya angka mortalitas, terkadang melampaui 50% tergantung pada populasi studi. *E. cloacae* telah menjadi penyebab infeksi nosokomial tersering ketiga. Isolat MDR *E. cloacae* dilaporkan telah menyebar dan membuat lebih mengkhawatirkan, sehingga membuat penanganan menjadi lebih sulit terhadap terapi empirik antibiotik. Suatu penilaian menunjukkan *resisten* global terhadap *cefepime* meningkat signifikan dari 36% pada 2004 hingga 63% pada 2014. Sementara 8,5% dari *E. cloacae* merupakan MDR di Asia Pasifik, namun sedikit lebih rendah di Amerika latin (14%). Faktor yang dominan berkontribusi terhadap

terjadinya resistansi *E. cloacae* mungkin melalui mediasi *plasmid AmpC β lactamases*, ESBL, Famili Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase (KPC) dari *Karbapenemase* dan *metallo β lactamase* dari VIM, IMP, NDM tipe 1. Produksi ESBL dan *AmpC β Beta lactamase* terjadi terus menerus di seluruh dunia. Produksi *AmpC β lactamases*, ESBL dan *Karbapenemase* merupakan pelopor pada MDR dan memiliki potensi penyebaran tinggi pada isolat *E. cloacae*. Laporan pada MDR *E. cloacae* cukup mengkhawatirkan. Angka durasi rawat inap yang lama di rumah sakit meningkat sejak abad ke 21 (Wang, *et. al.*, 2017; Bonomo, 2017).

Kelas *A Beta lactamase* atau dikenal dengan istilah ESBL. CTX-M-1 yang diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* yang didapat pada pasien dari Italia dan Jerman muncul pada awal tahun 1990. CTX M-1 merupakan anggota pertama dari Famili *Beta lactamase*, yang saat ini terdapat sembilan anggota yaitu CTX-M-1 (MEN-1), CTX-M-2, Toho-1, CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-5, Toho-2, CTX-M-6, CTX-M-7, and CTX-M-8. ESBL menyebabkan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) yang lebih tinggi pada *cefotaxime* dibandingkan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) pada *ceftazidim*.

CTX M-1 dan CTX M-2 yang hanya dikenali pada tahun 1990 dan 1992. Ada tujuh enzim CTX M baru lainnya yang kemudian dikenali pada 1998 dan 1999 menunjukkan bahwa Famili ESBL kecil namun cepat berkembang. Gen CTX M-3 pertama kali diidentifikasi pada 1998 dari *Citrobacter freundii* and *Escherichia coli* dari Rumah Sakit Praski di

Polandia. Enzim tersebut telah menyebar pada Famili *Enterobacteriales* lainnya (seperti pada *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, dan *Morganella morganii*). Hal tersebut dapat menjadi salah satu alasan diperlukan peta distribusi bakteri *E. cloacae* yang memiliki gen CTX M-3 khususnya di Indonesia (Doucet-Populaire, *et. al.*, 2000).

Organisme penghasil CTX M-3 dikenali pada level resistansi *Beta lactam* dengan pola berbeda beda. Hal tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kemungkinan variasi dari ekspresi CTX M-3, pemisahan dari penekanan mutasi *AmP C Beta lactamase*, dan perubahan permeabilitas. Doucet, *et. al.*, (2000), melaporkan ciri dari *strain* yang menghasilkan CTX M-3 dari pasien di Prancis dengan tanpa adanya riwayat perjalanan di tahun sebelumnya dari Polandia (Baraniak, *et. al.*, 2002).

3) Gen SHV-12

Gen SHV 12 merupakan salah satu prevalensi tipe SHV di Asia yang dapat memberi resistansi terhadap *Beta laktam*, *fluoroquinolone*, *aminoglikosida*, *sulfonamide*, dan transmisi yang berkaitan dekat dengan resistansi antibiotik dari *E. cloacae*. Resistansi pada *cefepime* dapat berkaitan dengan adanya SHV 12. Hal tersebut dapat menjadi salah satu

alasan diperlukan peta distribusi bakteri *E. cloacae* yang memiliki gen SHV-12 khususnya di Indonesia (Dumarche, *et. al.*, 2002).

D. Tinjauan Umum tentang PCR

Kemampuan laboratorium mikrobiologi klinik untuk mengidentifikasi dan mendeteksi bakteri patogen memiliki keterbatasan. Beberapa keterbatasan tersebut seperti beberapa patogen yang tumbuh lambat dan keberadaan jumlah organisme patogen yang sedikit. Jumlah organisme patogen yang sedikit contohnya seperti jumlah bakteri patogen kurang dari 5 *Colony Forming Unit* (CFU) per mililiter dari darah pasien dengan sepsis. Hal tersebut mengarahkan perubahan pemahaman identifikasi bakteri patogen dengan menguji sifat biokimia mikroorganisme menjadi identifikasi secara cepat dengan identifikasi hingga ke tingkat molekuler dari agen bakteri patogen. Salah satu jenis identifikasi molekuler yaitu PCR. PCR penting untuk dipahami oleh karena itu akan dibahas mengenai definisi, prinsip, tujuan, dan langkah-langkah dari PCR (de la Maza, *et. al.*, 2020).

Reaksi *polimerase* berantai atau yang lebih dikenal sebagai Polymerase Chain Reaction adalah suatu teknik perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus). Duplikasi target DNA terjadi pada setiap siklus. Teknik PCR bisa dikatakan sebagai salah satu inovasi atau kemajuan pesat hingga tingkat molekuler. Penerapan PCR begitu populer dilakukan di

bidang biokimia dan biologi molekuler karena hanya memerlukan jumlah sampel yang sedikit dan murah. Pemahaman tersebut memberikan harapan bahwa bisa dilakukan duplikasi DNA di mesin PCR dan dalam waktu cepat. Teknik PCR banyak memberikan manfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan. DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat dengan teknik ini sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA. PCR digunakan secara klinik hampir di semua laboratorium yang mengembangkan tes atau uji. PCR dapat digunakan sebagai uji diagnostik untuk penyakit infeksi. Keuntungan dari PCR yaitu kesederhanaan, kecepatan, dan biaya (Wittwer, *et. al.*, 2010).

Teknik PCR mulai berkembang setelah ditemukan pertama kali pada tahun 1955. Enzim DNA *polymerase* berfungsi sebagai enzim yang dapat melakukan replikasi DNA. Enzim DNA *polymerase* berhasil dibersihkan atau dimurnikan pada tahun 1958. Teknik PCR mulai dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary Mullis. Kary Mullis memperoleh hadiah Nobel pada tahun 1993. Evolusi dan perkembangan dari PCR dibahas secara baik di beberapa buku. Kesederhanaan dan tingginya tingkat keberhasilan amplifikasi *fragmen* DNA yang diperoleh menyebabkan teknik ini semakin berkembang dan semakin luas penggunaannya. Teknik amplifikasi/perbanyak DNA menggunakan PCR dapat meningkatkan jumlah susunan DNA menjadi ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan

menjadi dua kali jumlahnya. Setiap n siklus PCR akan diperoleh 2^n kali dari banyaknya DNA target. Beberapa manfaat dari PCR yaitu dapat digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, diagnostik penyakit infeksi oleh berbagai mikroorganisme (virus, bakteri, jamur/fungi, parasit), analisa genetik pada forensik, aplikasi keanekaragaman, evolusi biologi, *mutagenesis* DNA, dan kuantitatif *mRNA* pada sel ataupun jaringan (Bustin S.A., *et. al.*, 2010; de la Maza, *et. al.*, 2020).

PCR memiliki tujuan yaitu menghasilkan beberapa salinan dari suatu *fragmen* atau urutan DNA yang sintesis dan penggandaan DNA tersebut berlangsung di luar organisme, tepatnya di dalam suatu mesin PCR. Prinsip yang terjadi dalam sintesis DNA itu sama dengan proses perbanyak DNA yang terjadi di dalam sel. Prinsip dasar PCR yaitu proses replikasi DNA dengan siklus yang berulang meliputi *denaturasi*, *annealing* dan *ekstensi* oleh enzim DNA *polimerase*. Salinan DNA dimulai dari jumlah yang sedikit (nanogram= ng), kemudian setelah mengalami beberapa siklus, maka salinan DNA akan menjadi hingga jutaan kali lipat. Prinsip PCR dianjurkan untuk dipahami terlebih dahulu sebelum melaksanakan teknik PCR secara langsung. Hal tersebut dapat memberikan gambaran dalam pelaksanaan sehingga dapat mengatasi kendala teknis yang terjadi pada saat melakukan teknik PCR secara langsung. Teknik PCR diarahkan oleh perubahan suhu. DNA cetakan utama yaitu *denaturasi* atau dipisahkan asam nukleatnya oleh panas (dengan suhu 90°C hingga 95°C). Tahapan selanjutnya yaitu *annealing* dengan cara menurunkan suhu (dengan suhu 55°C hingga

65⁰C). Tiga langkah siklus dijalankan jika terdapat tiga suhu yang berbeda. Langkah ketiga yaitu *ekstensi*. Materi pokok berupa DNA untai ganda hasil isolasi suatu organisme direaksikan dengan komponen-komponen PCR yang terdiri dari: enzim DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTPs), MgCl₂, dan *primer* (potongan pendek DNA untai tunggal) yang mengawali sintesis DNA. Setelah larutan *mix* PCR tersebut homogen, larutan tersebut siap direaksikan dalam mesin PCR. Sepasang *primer* oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat *hibrid* dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan akan mengamplifikasi urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR umumnya terdiri dari 30-35 siklus meliputi *denaturasi* (95°C) selama 30 detik, *annealing* (55–60°C) selama 30 detik, dan *ekstensi* (72°C). Peningkatan jumlah siklus PCR di atas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif (Persing H., *et. al.*, 2016; Maftuchah, *et.al.*, 2014).

Tahap pertama pada sistem amplifikasi PCR adalah *denaturasi* DNA sampel dengan menaikkan suhu dalam tabung reaksi sampai 95⁰C. Tabung reaksi ini berisi DNA target, dua *primer oligonukleotida* dalam jumlah berlebih, *taq* DNA *polymerase* yang tahan panas, keempat *deoksiribonukleotida* dan *buffer* yang mengandung Mg. Ikatan ganda DNA akan terbuka saat proses *denaturasi* sehingga menjadi untai tunggal DNA (ssDNA). Proses *denaturasi* berlangsung selama 1 hingga 2 menit. *Denaturasi* untai ganda DNA merupakan salah satu langkah yang penting selama proses PCR. Suhu yang tinggi pada awal proses menyebabkan

pemisahan untai ganda DNA. Pemahaman tersebut dapat menjadi panduan dalam mengatasi kendala teknis yang terjadi pada saat melakukan teknik PCR dan menentukan keberhasilan PCR. Kegagalan proses PCR dapat disebabkan salah satunya karena DNA kembali membentuk untai ganda (*renaturasi*). Waktu *denaturasi* yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim *taq* DNA *polymerase*. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5⁰C; 95⁰C dan 97,5⁰C. Suhu yang dijalankan saat *denaturasi* pada kisaran 92⁰C-95⁰C. Suhu 94⁰C saat *denaturasi* merupakan pilihan standar. Tahap kedua pada sistem amplifikasi PCR adalah *primer annealing*. *Primer annealing* merupakan pengenalan suatu *primer* terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi *primer* itu sendiri. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran *primer*, semakin tinggi suhunya. Kisaran suhu penempelan yang digunakan adalah antara 37⁰C sampai dengan 60⁰C. *Primer* menempel pada sekuen komplementernya pada DNA target di tahapan ini (Bermingham, *et. al.*, 2003).

Suhu optimal pada *annealing* dimulai dengan menghitung *melting temperature* (T_m) dari cetakan DNA dan ikatan *primer*. Terdapat beberapa cara perhitungan untuk memperoleh T_m. Cara paling mudah menghitung untuk mendapatkan *melting-temperatur* yang tepat menggunakan rumus $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$. Suhu *annealing* biasanya 5⁰C di bawah T_m *primer* yang sebenarnya. *Melting temperature* dipengaruhi oleh cetakan

DNA, komponen buffer, dan konsentrasi *primer*. Ada hal yang harus dihindari saat melaksanakan PCR yaitu keadaan *mispriming*. *Mispriming* yaitu penempelan *primer* pada tempat yang salah. Salah satu cara agar tidak terjadi *mispriming* yaitu suhu *annealing* tidak dianjurkan kurang dari 37°C. Hal tersebut dilakukan agar proses perbanyakan DNA lebih efisien. Produk salinan DNA dengan spesifisitas tinggi biasanya dilakukan dengan mengatur suhu sekitar 55°C pada proses *annealing*. *Primer* akan menempel pada posisi ujung 5' dari untai DNA target dan dari urutan nukleotida yang sudah sesuai dengan urutan nukleotida *primer* tersebut (Yuwono, 2006).

Tahap ketiga pada PCR yaitu *ekstensi*. Proses pemanjangan untai baru DNA terjadi pada tahap *ekstensi*. Proses *ekstensi* dimulai dari posisi *primer* yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target. *Primer* akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Setiap satu kilobase (1000 pb) yang akan diperbanyak memerlukan waktu 1 menit. Proses pemanjangan DNA yang kurang dari 500 pb memerlukan waktu hanya 30 detik. Proses pemanjangan DNA sekitar 500 pb tapi kurang dari 1 Kb membutuhkan waktu 45 detik. Setiap lebih dari 1 Kb yang diperbanyak akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya. Temperatur *ekstensi* berkisar antara suhu sekitar 70-72°C (Fatchiyah, *et. al.*, 2011).

Proses PCR memerlukan empat komponen utama, yaitu: (1) enzim DNA *polimerase*, (2) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), (3)

oligonukleotida *primer* spesifik yaitu suatu oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA dan (4) DNA cetakan (*template*) yang merupakan *fragmen* DNA yang akan diperbanyak. Enzim DNA *polimerase* merupakan enzim yang mengkatalisasi reaksi pembentukan suatu DNA. Enzim DNA *polimerase* berperan penting dalam replikasi DNA. Enzim tersebut diperlukan untuk tahap *ekstensi*. Enzim *polimerase* DNA diisolasi dari bakteri yang tahan terhadap suhu panas. Enzim ini bersifat stabil sampai dengan suhu 95°C. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Pemahaman tersebut memberikan arahan mengenai komponen-komponen yang penting disediakan dalam pelaksanaan teknik PCR. Komponen lain dalam PCR yang juga penting adalah senyawa buffer PCR, Mg²⁺, dan *thermal cycler*. Salah satu komponen PCR yaitu DNA cetakan. DNA cetakan berfungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. DNA cetakan ini dapat berupa DNA kromosom, DNA *plasmid* ataupun *fragmen* DNA apapun dengan syarat bahwa di dalam DNA cetakan tersebut mengandung *fragmen* DNA target yang dituju. Prinsip isolasi DNA *kromosom* atau DNA *plasmid* adalah memecah dinding sel. Prinsip isolasi DNA mendukung untuk memperoleh kualitas DNA yang murni. Kemurnian DNA target sangat penting. Ketidakmurnian suspensi DNA dapat memengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA *polimerase*. Pemahaman tersebut menyatakan bahwa kemurnian DNA target sangat penting sehingga memudahkan reaksi amplifikasi dan kerja

enzim DNA *polimerase*. Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari *primer* yang digunakan. *Primer* berfungsi sebagai pembatas salinan DNA target yang akan dilakukan amplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses *eksistensi* DNA. Perancangan *primer* dapat dilakukan berdasarkan dari urutan protein nukleotida yang akan dituju. Data urutan protein nukleotida bisa didapatkan dari database GenBank[®]. Perancangan suatu *primer* dapat didasarkan dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat. Penyusunan *primer* disusun dari urutan oligonukleotida sepanjang 15-32 pasangan basa (pb) pada ujung -5' pita DNA cetakan. Hal hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan perancangan *primer* seperti panjang *primer*, komposisi *primer*, *melting temperature* (Tm), interaksi *primer-primer* (Soejadi, 2008).

Panjang *primer* berkisar antara 18–30 pasangan basa. *Primer* dengan panjang kurang dari 18 pasangan basa akan menjadikan spesifisitas *primer* menjadi rendah. Untuk ukuran *primer* yang pendek kemungkinan terjadinya *mispriming* (penempelan *primer* di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi. Hal ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari *primer* tersebut, dan nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Pemahaman tersebut memberikan panduan untuk mencapai efektifitas dan efisiensi PCR dengan cara menetapkan panjang *primer* secara tepat. *Primer* dengan panjang lebih dari 30 pasangan basa tidak akan meningkatkan spesifisitas *primer* secara bermakna. Hal tersebut akan

membuat biaya perancangan *primer* menjadi lebih mahal. Komposisi *primer* perlu diperhatikan dalam merancang suatu *primer*. Rentetan/urutan nukleotida yang sama wajib untuk dihindari. Hal itu akan dapat menurunkan spesifisitas *primer* yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming*. Spesifitas *primer* yang rendah akan memengaruhi terjadinya kegagalan proses PCR. Kandungan (G+C) (persentase jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Hal tersebut dianjurkan karena *primer* dengan persentase (G+C) rendah diduga tidak akan mampu berkompetisi/bersaing untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju. Hal ini akan menurunkan efisiensi proses PCR. Urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih cenderung bersifat tidak cocok jika dibandingkan nukleotida G atau C. Spesifisitas *primer* akan menjadi rendah apabila hal tersebut terjadi. *Melting temperatur* (T_m) adalah temperatur di mana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu *primer* sangat penting karena T_m *primer* akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR. T_m berkaitan dengan komposisi *primer* dan panjang *primer*. *Melting temperatur primer* dapat dihitung dengan menggunakan rumus $[2(A+T) + 4(C+G)]$ secara teoritis. Suhu T_m *primer* yang disarankan yaitu berkisar antara suhu 50⁰C hingga 65⁰C. Interaksi *primer-primer* seperti *self-homology* dan *cross-homology* juga wajib dihindari. Suatu keadaan *mispriming* juga wajib dihindari. Hal ini dapat menyebabkan spesifisitas *primer* menjadi rendah dan konsentrasi *primer* yang digunakan menjadi berkurang selama proses

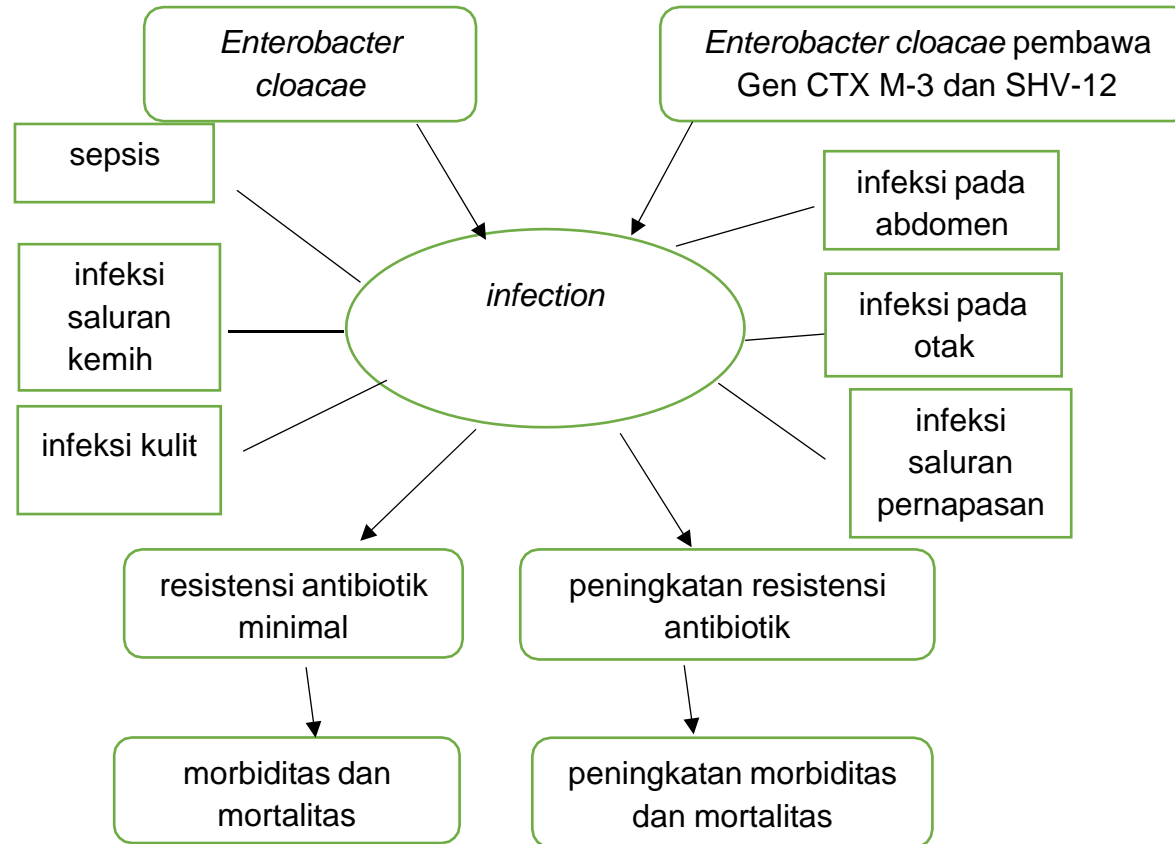
karena terjadinya *mispriming*. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR. Nukleotida (dNTPs) merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Nukleotida berperan sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses *ekstensi*. Nukleotida (dNTP) akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari *primer* dan membentuk untai baru yang bersifat melengkapi dengan untai DNA cetakan. Konsentrasi optimal *dNTPs* untuk proses PCR harus ditentukan (Hasibuan, 2015; Persing H., *et al.*, 2016).

Teknik PCR telah berevolusi pada bidang penyakit infeksi. PCR cukup identik pada penyakit infeksi walaupun terdapat cara lain mendiagnosis penyakit infeksi melalui *sequencing* genom pada agen patogen penyebab. Diagnosis penyakit infeksi dapat dinyatakan sebagai kemampuan untuk menetapkan kelompok patogen sebagai penyebab dari gejala pasien sehingga menyingkirkan dari kemungkinan lainnya. Uji diagnostik yang baik harus mampu mengatakan kepada klinisi bahwa suatu penyakit bukan disebabkan oleh agen patogen X melainkan disebabkan oleh patogen Y. PCR tidak digunakan sebagai pemeriksaan rutin dalam mendiagnosis penyakit infeksi. Pemahaman tersebut dapat memberikan petunjuk bahwa teknik PCR berperan penting dalam identifikasi agen patogen penyebab penyakit infeksi (Hugget, 2010).

Identifikasi dan klasifikasi spesies *E. cloacae* yang cukup memakan waktu dengan metode seperti *serotyping*, *colony morphotyping*, teknik

kultur konvensional, analisis morfologi, dan biokimia. Peningkatan teknologi pengujian molekuler untuk mengidentifikasi spesies *E. cloacae*, seperti analisis DNA polimorfik secara acak diduga telah mengatasi keterbatasan ini selama beberapa tahun terakhir. Metode seperti PCR tunggal dan langsung atau PCR *multipleks* belum digunakan secara luas meskipun sangat *susceptible* dan spesifik dengan waktu putar yang lebih singkat (Hugget, 2010).

E. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

F. Definisi Operasional

1. Isolat *E. cloacae*

Isolat bakteri *E. cloacae* pada penelitian ini adalah isolat bakteri yang diperoleh dari Instalasi Sentral Laboratorium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin yang telah diidentifikasi secara otomatis menggunakan alat Vitek 2[®] sebagai *E. cloacae*. Isolat yang digunakan adalah isolat *E. cloacae* yang dikumpulkan dari periode Agustus 2018 hingga April 2021.

2. Genotip CTX M-3

Genotip CTX M-3 pada penelitian ini adalah jenis gen yang dimiliki oleh *E. cloacae* yang membawa sifat resistansi terhadap antibiotik.

Kriteria objektif:

- a. *E. cloacae* positif CTX M-3 bila hasil amplifikasi PCR DNA *E. cloacae* ditemukan *band* dengan panjang 780 pasang basa.
- b. *E. cloacae* negatif CTX M-3 bila hasil amplifikasi PCR DNA *E. cloacae* tidak ditemukan *band* dengan panjang 780 pasang basa.

3. **Genotip SHV-12**

Genotip SHV-12 pada penelitian ini adalah jenis gen yang dimiliki oleh *E. cloacae* yang memiliki sifat menyandi resistansi terhadap antibiotik.

Kriteria objektif:

- a. *E. cloacae* positif SHV-12 bila hasil amplifikasi PCR DNA *E. cloacae* ditemukan *band* dengan panjang 865 pasang basa.
- b. *E. cloacae* negatif SHV-12 bila hasil amplifikasi PCR DNA *E. cloacae* tidak ditemukan *band* dengan panjang 865 pasang basa.