

KARYA AKHIR

ANALISIS GEN *TEMONIERA* (TEM), *SULFHYDRYL VARIABLE* (SHV) DAN *CEFOTAXIM MUNICH* (CTX-M) PADA ISOLAT *ESCHERICHIA COLI* PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE* (ESBL) DI RSUP dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR

ANALYSIS OF TEMONIERA (TEM), SULFHYDRYL VARIABLE (SHV) AND CEFOTAXIME MUNICH (CTX-M) GENES IN ISOLATES OF ESBL-PRODUCING ESCHERICHIA COLI ISOLATES IN DR. WAHIDIN SUDIROHUSODO HOSPITAL, MAKASSAR

ASRIYANI AZIKIN

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (SP.1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

KARYA AKHIR

**ANALISA GEN *TEMONIERA* (TEM), *SULFHYDRYL VARIABLE* (SHV)
DAN *CEFOTAXIM MUNICH* (CTX-M) PADA ISOLAT *ESCHERICHIA COLI*
PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE* (ESBL) DI
RSUP dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR**

***ANALYSIS OF TEMONIERA (TEM), SULFHYDRYL VARIABLE (SHV) AND
CEFOTAXIME MUNICH (CTX-M) GENES IN ISOLATES OF ESBL-
PRODUCING ESCHERICHIA COLI ISOLATES IN DR. WAHIDIN
SUDIROHUSODO HOSPITAL, MAKASSAR***

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Mencapai Gelar Spesialis-1 (Sp.1)

Program Studi

Ilmu Patologi Klinik

Disusun dan Diajukan oleh

Asriyani Azikin

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (SP-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

KARYA AKHIR

ANALISA GEN *TEMONIERA* (TEM), *SULFHYDRYL VARIABLE* (SHV) DAN *CEFOTAXIM MUNICH* (CTX-M) PADA ISOLAT *ESCHERICHIA COLI* PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE* (ESBL) DI RSUP dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR

Yang disusun dan diajukan oleh

ASRIYANI AZIKIN

Nomor Pokok C108214105

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 12 April 2018

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,

dr. Benny Rusli, SpPK(K)

dr. Uleng Bahrun, SpPK(K), PhD

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Ketua KPPS Dokter Spesialis

Dekan

Fakultas Kedokteran Unhas

Fakultas Kedokteran Unhas

Dr. dr. Syafrî K. Arif, Sp.An-KIC-KAKV

Prof. dr. Budu, Ph.D, M.MedEd, SpM(K)

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda di bawah ini

Nama : ASRIYANI AZIKIN
Nomor Mahasiswa : C108214105
Program Studi : Ilmu Patologi Klinik
Konsentrasi : Program Pendidikan Dokter Spesialis

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, April 2018

Yang menyatakan,

Asriyani Azikin

PRAKATA

Segala puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan ke hadirat Allah yang Maha Kuasa, Maha Pemurah, Maha Pengasih dan Penyayang atas segala anugerah dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “ANALISIS GEN *TEMONIERA* (TEM), *SULFHYDRYL VARIABLE* (SHV) DAN *CEFOTAXIM MUNICH* (CTX-M) PADA ISOLAT *ESCHERICHIA COLI* PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE* (ESBL) DI RSUP dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR” sebagai salah satu persyaratan mencapai gelar spesialis Patologi Klinik pada Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih sangat jauh dari kesempurnaan sehingga dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan koreksi dari berbagai pihak. Penulis juga menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak. Dalam kesempatan ini, dengan segenap ketulusan hati penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan dan perhatian serta kesabaran yang tulus dari DR. Benny Rusli, SpPK(K) selaku Ketua Komisi Penasehat/Pembimbing Utama dan Ketua Tim Penilai dan dr. Ulung Bahrn, Sp.PK(K), Ph.D selaku Anggota Komisi Penasehat/Sekretaris Tim Penilai, dr. Burhanuddin Bahar, MS sebagai Anggota Komisi penasehat/Pembimbing

Metode Penelitian Statistik dan Anggota Tim Penilai, dr. Rizalinda Sjahrir, M.Sc, PhD dan Dr. dr.Tenri Esa, M.Si, Sp.PK yang telah memberi kesediaan waktu dan saran mulai saat pengembangan minat terhadap pelaksanaan penelitian dengan segala permasalahan sampai dengan selesainya tesis ini.

Penulis sangat menyadari bahwa selesainya pendidikan dan penulisan tesis ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setulus-tulusnya kepada:

1. Guru Besar Emeritus Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (FK UNHAS), Prof. dr. Hardjoeno, Sp.PK(K), (Alm) yang sampai akhir hayatnya beliau senantiasa merintis pendidikan dokter Spesialis Patologi Klinik.
2. Guru sekaligus orang tua kami, dr. H. Ibrahim Abd.Samad, Sp.PK(K) dan dr. Hj. Adriani Badji, Sp.PK, dr. Ruland DN Pakasi, Sp.PK(K), dr. Hj. Darmawaty ER, Sp.PK(K) serta seluruh guru dan supervisor di Departemen Ilmu Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, yang senantiasa mendukung pendidikan penulis sejak awal, mendidik, membimbing dengan penuh ketulusan hati dan memberi nasehat kepada penulis.
3. Guru Besar Departemen Ilmu Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Prof. dr. Mansyur Arif, Ph.D, Sp.PK(K) yang membimbing, mengajar dan memberi ilmu yang tidak ternilai harganya serta memberi dukungan dan bimbingan penelitian ini.

4. Ketua Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS sekaligus Penasehat Akademik penulis, dr. Ueng Bahrun, Sp.PK(K), Ph.D, yang senantiasa membimbing, mengajar dan memberikan arahan kepada penulis,, memberi nasehat dan semangat serta mendorong penulis agar lebih maju.
5. Ketua Program Studi Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS, Dr. dr.Tenri Esa, M.Si, Sp.PK, guru kami yang senantiasa membimbing, memberikan arahan, nasehat serta motivasi kepada penulis.
6. Sekretaris Program Studi Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS, dr. Rachmawati AM, Sp.PK(K), guru kami yang penuh pengertian dan senantiasa memberi bimbingan dan mengajar penulis.
7. Direktur RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menjalani pendidikan dan mengumpulkan sampel di rumah sakit ini.
8. Koordinator Unit Penelitian FK-UNHAS beserta staf yang telah memberi izin dan membantu proses pemeriksaan sampel untuk penulis.
9. Kepala Instalasi Laboratorium RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, Kepala Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RS. Perguruan Tinggi Negeri Universitas Hasanuddin Makassar, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Labuang Baji, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Stela Maris, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Ibnu Sina, Direktur UDD PMI, Kepala Unit Transfusi Darah Provinsi Sulawesi Selatan, Kepala Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK), Kepala Departemen Ilmu Penyakit

Dalam beserta seluruh staf yang telah memberikan kesempatan dan membantu selama menjalani masa pendidikan.

10. Seluruh teman-teman sejawat PPDS Bagian Ilmu Patologi Klinik, khususnya teman-teman seangkatan periode Juli 2014 (dr. Sri Anita, dr. Rahmi Rifany Latief, dr. Kartika Paramita, dr. Gita Medita sanusi, dr. Sarasawati Wulandari Hartono, dr. Dewi Sri Kartini, dr, Dewi Kartika Tungadi, dan dr. Melisa) dalam berbagi suka maupun duka selama masa pendidikan penulis. Seluruh teman PPDS Patologi Klinik yang telah banyak memberikan bantuan, dukungan kepada penulis selama masa pendidikan dan penyelesaian tesis ini, kebersamaan kita tidak akan pernah dilupakan.
11. Kepala Unit Penelitian Fakultas Kedokteran UNHAS beserta staf yang telah memberi izin dan membantu dalam proses pemeriksaan sampel penelitian ini.
12. Pada pasien yang dengan sukarela telah berpartisipasi dengan senang hati dalam penelitian ini, bantuan dari bapak/ibu dan keluarga sangat berarti bagi penulis.
13. Kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan moril maupun materil secara langsung maupun tidak langsung, penulis mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga.

Penulis secara khusus menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tua terkasih ayahanda Drs. H. M. Nur Azikin dan ibunda Dra. Hj. St. Nurbaya. yang sangat penulis hormati, dengan ketulusan dan penuh kasih sayang mereka dalam memberikan dukungan dan tenaga, dukungan moril dan materil serta doa yang senantiasa mengiringi langkah penulis. Untuk saudara-saudaraku tercinta. Dr. Ir. M. Tahir Azikin, MSi, dr. Hermawati Azikin, SpPD, M. Natsir Azikin, ST, Wahyudi Azikin, ST dan dr. Wildana Azikin, MKes, Sp.A, atas tenaga, dukungan, penyemangat dan doanya selama penulis menempuh pendidikan ini.

Terima kasih khususnya kepada suami tercinta, Lettu Ckm Darwis, S.Sos, terima kasih atas cinta, pengertian dan pengorbanan, dukungan semangat serta doa yang tulus selama ini yang telah mengiringi perjalanan panjang penulis dalam mengikuti pendidikan ini. Untuk buah hatiku yang tersayang Muhammad Nabil Aqil dan Muhammad Nafis Alim, terima kasih atas semua pengorbanannya menemani ibu, meskipun begitu banyak kebersamaan yang terlewatkan karena kesibukan ibu, tetapi kalian semua selalu menjadi sumber semangat bagi ibu menyelesaikan pendidikan ini. Melalui kesempatan ini pula perkenankanlah penulis menghaturkan permohonan maaf yang sedalam-dalamnya atas kesalahan dan kekhilafan yang telah dilakukan baik sengaja maupun tidak sengaja, selama masa pendidikan hingga selesainya tesis ini.

Akhirnya penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat bagi kita semua dan dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan Ilmu Patologi Klinik di masa yang akan datang. Semoga Allah SWT, senantiasa meridhoi dan memberkahi setiap langkah pengabdian kita. Amin.

Makassar, 10 April 2018

Asriyani Azikin

ABSTRAK

ASRIYANI AZIKIN. Analisis gen Temoniera (TEM), Sulfhydryl Variable (SHV) dan Cefotaxime Munich (CTX-M) Pada Isolat *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL) di RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar (Dibimbing Oleh Benny Rusli dan Uleng Bahrin)

Salah satu problem resistensi antibiotik di Rumah sakit adalah *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL, yang salah satunya adalah *Escherichia coli*. *Extended-spectrum β -lactamase* adalah enzim yang mampu menghidrolisis antibiotik golongan *penicillin*, *cephalosporin* generasi ketiga dan golongan monobactam, dihambat oleh *β -lactamase inhibitor* dan tidak terpengaruh oleh antibiotik golongan *cephamycins* dan *carbapenem*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya gen TEM, SHV dan CTX-M pada *isolate Escherichia coli* penghasil ESBL dan mengetahui hubungan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 dengan keberadaan gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar serta mengetahui karakteristik genetik *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar. Didapatkan 42 sampel *E. coli* dengan fenotip ESBL positif. Distribusi gen SHV 1(2,4%), gen TEM sebanyak 40 (95,2%) dan gen CTX-M 42 (100%). *Isolate* yang memiliki dua gen (TEM dan CTX-M) sebesar 93%, yang memiliki tiga gen (TEM, SHV dan CTX-M) 2% dan satu gen (CTX-M) 5%. *isolate* lebih banyak ditemukan pada urin (33,2%) dan pus (42,9%), dengan diagnosa terbanyak pada penyakit sistem genitourinaria. Golongan *carbapenem* memiliki nilai sensitif yang tinggi terhadap ESBL-EC (imipenem (97,6%), doripenem dan carbapenem (100%)). Nilai MIC tidak berbeda bermakna antara ditemukan atau tidak ditemukannya gen TEM dan SHV pada ESBL-EC.

Kata Kunci : ESBL, *Escherichia coli*, TEM, SHV, CTX-M, MIC

ABSTRACT

ASRIYANI AZIKIN. Analysis of Temoniera gene (TEM), Sulfhydryl Variable (SHV) and Cefotaxime Munich (CTX-M) On Isolate *Escherichia coli* Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) producer at dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar (Guided by Benny Rusli and Uleng Bahrun)

One of the problems of antibiotic resistance in hospitals is ESBL-producing Enterobacteriaceae, one of which is *Escherichia coli*. Extended-spectrum β -lactamase is an enzyme capable of hydrolyzing penicillin-type antibiotics, third-generation cephalosporins and monobactam groups, inhibited by β -lactamase inhibitors and unaffected by cephamycins and carbapenems antibiotics. The purpose of this research is to know the existence of TEM, SHV and CTX-M genes in ESBL *Escherichia coli* isolate and to know the relation of Minimum Inhibitory Concentration CLSI M100-S27 value in the presence of TEM, SHV and CTX-M genes in ESBL *Escherichia coli* in Makassar and knowing the genetic characteristics of ESBL *Escherichia coli* in Makassar. There were 42 *E. coli* samples with ESBL positive phenotype. The distribution of SHV gene 1 (2.4%), TEM gene as much as 40 (95.2%) and CTX-M 42 (100%) genes. Isolate has two genes (TEM and CTX-M) of 93%, which has three genes (TEM, SHV and CTX-M) 2% and one gene (CTX-M) 5%. isolate was more common in urine (33.2%) and pus (42.9%), with most diagnoses in genitourinary system disease. Carbapenem groups have high sensitivity to ESBL-EC (imipenem (97,6%), doripenem and carbapenem (100%)). MIC values were not significantly different between the findings or absence of TEM gene and SHV in ESBL-EC.

Keywords : ESBL, *Escherichia coli*, TEM, SHV, CTX-M, MIC

Keywords : ESBL, *Escherichia coli*, TEM, SHV, CTX-M, MIC

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	ii
PRAKATA	iii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN	
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	6
D. Hipotesis	7
E. Manfaat Penelitian	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. ANTIBIOTIK	8

B. ESCHERICHIA COLI	13
C. EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE	14
D. PEMERIKSAAN LABORATORIUM ESBL	26
III. KERANGKA PENELITIAN	
A. Kerangka Teori	34
B. Kerangka Konsep	35
IV. METODE PENELITIAN	
A. Desain Penelitian	36
B. Tempat dan Waktu Penelitian	36
C. Populasi dan Sampel Penelitian	37
D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	38
E. Ijin Penelitian	38
F. Cara Kerja	39
G. Skema Alur Penelitian	49
H. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif	50
I. Analisis Data	52
J. Hasil dan Pembahasan	54
K. Simpulan dan saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN	84

DAFTAR TABEL

Nomor		halaman
1	Penggolongan antibiotik β - <i>lactam</i> berdasarkan Permenkes RI tahun 2011	9
2	Klasifikasi <i>Beta laktamases</i> berdasarkan Bush Jacoby Medeiros dan Ambler	16
3	Interpretasi test skrining dengan metode disk diffusion dan MIC determination berdasarkan CLSI guidelines	26
4	Urutan nukleotida pada oligonukleotida yang digunakan untuk amplifikasi PCR	42
5	Standar Interpretasi <i>Minimal Inhibitori Concentration Enterobacteriaceae</i> (CLSI, 2012)	51
6	Karakteristik sampel penelitian	55
7	Karakteristik genetik E. Coli penghasil ESBL	57
8	Karakteristik gen TEM, SHV dan CTX-M pada E. coli penghasil ESBL terhadap tes sensitivitas antibiotic	58
9	Karakteristik E. coli penghasil ESBL pada kelompok 1 gen, kelompok 2 gen dan kelompok 3 gen terhadap tes sensitivitas antibiotic	60
10	Nilai MIC antibiotik pada gen TEM	61
11	Nilai MIC antibiotik pada gen CTX-M	63
12	Nilai MIC antibiotik pada gen SHV	64
13	Nilai MIC antibiotik berdasarkan jumlah gen	65

DAFTAR GAMBAR

Nomor		halaman
1	Struktur cincin β -lactam pada antibiotik golongan β -lactam	10
2	Mekanisme kerja antibiotik terhadap mikroorganisme	12
3	Transfer gen resisten secara horizontal	23
4	Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik β -laktam	24
5	Prinsip kerja <i>Polymerasa Chain Reaction</i>	32
6	Prevalensi E.coli berdasarkan ruang perawatan	56

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
AES	<i>Advanced expert system</i>
AMRIN	<i>Antimicrobial resistance in Indonesia</i>
B	Beta
<i>bla</i>	Gen beta lactamase
CA	Clavulanic acid
CDT	<i>Combination disk test</i>
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
CTX-M	Cefotaxim munich
DNA	Deoksiribonukleat Acid
EDTA	Ethyenediaminetetraacetic Acid
ESBL	<i>Extended spectrum beta lactamase</i>
ESBL-EC	ESBL producing <i>E. coli</i>
ESC	<i>Extended spectrum cephalosporin</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal Pathogenis Escherichia coli</i>
F	<i>Forward</i>
H ₂ S	Hidrogen sulfide
IPEC	<i>Intestinal pathogenic Escherichia coli</i>

ISK	Infeksi saluran kemih
LPS	Lipopolisakarida
MAC	MacConkey
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
NaCl	Natrium chloride
NBM	<i>Newborn meningitis</i>
OMP	<i>Outer membrane proteins</i>
OXA	<i>Active on Oxacilin</i>
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PER	<i>Pseudomonas Extended Resistant</i>
pI	<i>Isoelectric Points</i>
R	<i>Reverse</i>
SHV	<i>Sulfhydryl variable</i>
SMART	<i>Studies for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>
TEM	Temoniera
TSIA	<i>Triple sugar iron agar</i>
VEB	<i>Vietnam extended spectrum β-lactamase</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan kelayakan etik

Lampiran 2. Data Dasar

Lampiran 3. Hasil PCR dan elektroforesis isolate *Escherichia coli* penghasil

ESBL

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Resistensi antibiotik adalah kemampuan mikroorganisme untuk bertahan terhadap efek antibiotik, yang awalnya masih bersifat sensitif terhadap efek antibiotik yang kemudian tidak efektif lagi terhadap terapi. Resistensi antibiotik saat ini menjadi masalah kesehatan yang global di dunia, baik di negara maju maupun berkembang. Infeksi patogen yang resisten terhadap antibiotik membutuhkan perawatan yang lama, meningkatkan biaya pengobatan, meningkatkan lama rawat di rumah sakit dan penggunaan peralatan kesehatan dan hasilnya meningkatkan morbiditas dan mortalitas serta berdampak pada perekonomian (CDC, 2013; WHO, 2014).

Masalah resistensi antibiotik oleh mikroorganisme khususnya terfokus pada patogen gram negatif karena mereka menjadi resisten terhadap hampir semua antibiotik, bakteri gram negatif yang memproduksi β -lactamase, memiliki kemampuan menyebar secara global. Infeksi gram negatif yang paling serius berhubungan dengan infeksi nosokomial adalah infeksi yang disebabkan oleh *Enterobacteriaceae* (CDC 2013, Alyamani 2017).

Enterobacteriaceae penghasil *Extended spectrum β -lactamase* adalah *Enterobacteriaceae* yang mensintesis enzim *beta lactamase (β -lactamase)* yang mampu menghidrolisis cincin *β -lactam* sehingga menyebabkan resistensi terhadap antibiotik golongan *β -lactam* (Herwana E, 2008). Dua jenis spesies *Enterobacteriaceae* yang paling sering menghasilkan ESBL yaitu *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* (EUCAST, 2012).

Strain *enterobactericeae* yang menghasilkan ESBL pertama kali dilaporkan tahun 1980. Dua puluh tahun kemudian ESBL dilaporkan sebagai penyebab emergensi infeksi nosokomial terutama infeksi traktus urinaria. Selanjutnya pada pertengahan 2000-an terjadi dua perubahan besar epidemiologi yang menyebabkan emergensi infeksi ESBL, yaitu pertama, ditemukannya ESBL pada komunitas, yang sebelumnya hanya dapat diisolasi di rumah sakit dengan strain terbanyak adalah *Escherichia coli*. Kedua, produksi enzim ESBL, *Cefotaxime Munich (CTX-M)* yang sangat berbeda dengan derivat mutan gen *Temoniera (TEM)* dan *Sulfhydryl Variable (SHV)* (Woerther L.P., 2013).

Penyebaran infeksi nosokomial dan infeksi pada komunitas yang disebabkan oleh *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL merupakan masalah penting bagi klinisi karena keterbatasan pilihan terapi untuk organisme tersebut (Rodríguez-B.J., 2008). *Centers for Disease Control and Prevention* membuat strategi untuk menghadapi resistensi antibiotik yang terdiri dari

empat bagian, yaitu deteksi dan pemetaan pola resistensi antibiotik, peningkatan penggunaan dan persepsian antibiotik yang tepat, pencegahan terjadinya infeksi dan penyebaran bakteri resisten serta penemuan antibiotik baru dan tes diagnostik baru untuk bakteri resisten (CDC, 2014).

Deteksi dini *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dapat membantu pemilihan antimikroba dan pengendalian infeksi secara tepat (Harris AD, 2007). Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi ESBL terdiri dari tes skrining dan tes konfirmasi. Tes konfirmasi membutuhkan waktu tambahan sehingga pemberian terapi yang tepat menjadi tertunda (Pfaller MA, 2006).

Pada tahun 2010, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) menurunkan nilai sensitifitas beberapa cephalosporin dan aztreonam untuk *Enterobacteriaceae* sehingga tes skrining dan konfirmasi ESBL tidak lagi diperlukan kecuali untuk tujuan pengendalian infeksi dan epidemiologi. (Wang P, 2011).

Laboratorium Patologi Klinik sub Divisi Infeksi Tropis RSUP Dr. Wahidin Sudirohudoso menggunakan alat Vitek 2 sebagai tes diagnostik secara *in vitro* dalam mengidentifikasi mikroba secara otomatis dan menggunakan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) berdasarkan CLSI M100-S27 tahun 2013 untuk interpretasi resistensi antibiotik pada golongan *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017).

Extended spectrum β -lactamase pada umumnya didapatkan melalui transfer gen secara horizontal dan resisten terhadap *oxymino cephalosporin*,

beberapa diantaranya derivat mutan yang terbentuk β -lactamases yang dimediasi plasmid (TEM/SHV) atau berasal dari bakteri sekitar (CTX-M). (Peter M Hawkey, 2009). Gen SHV umumnya didapat pada *Klebsiella pneumoniae*, tetapi dapat menyebar melalui plasmid ke *Enterobacteria* lainnya. TEM dilaporkan pertama kali ditemukan pada *E. coli* sedangkan CTX-M merupakan gen baru yang ditemukan mengkode enzim β -lactamases . (Shaikh Sibhghatulla 2014). Pada tahun 1990-an tipe TEM dan SHV adalah tipe dominan dari ESBL, tetapi penelitian terkini menunjukkan bahwa ESBL tipe CTX-M telah mengganti ESBL tipe TEM dan SHV (Hernandez J, 2012).

Deteksi genotip ESBL dengan teknik PCR merupakan teknik molekuler yang tidak meragukan dan memiliki peranan penting dalam pemeriksaan laboratorium untuk kepentingan skrining, melacak dan memonitor penyebaran ESBL di rumah sakit dan komunitas (Sibhghatulla, 2014). Karakteristik genotipe ESBL dapat membantu mengetahui substrat yang dihidrolisis oleh antibiotik sehingga dengan mengetahui jenis gen penyandi ESBL pada *Escherichia coli* pada suatu daerah maka dapat diketahui antibiotik yang sesuai untuk digunakan sebagai terapi empiris pada daerah tersebut (Paterson DL, 2005; Canton R, 2006). Karakteristik genetik ESBL yang terdapat di Makassar pernah diteliti oleh pathricia (2015), dimana gen terbanyak adalah TEM, sementara gen CTX-M-15 yang merupakan salah satu family gen CTX-M yang dominan dari ESBL tidak ditemukan . Oleh

karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti kembali dalam populasi dan waktu yang berbeda untuk mengevaluasi adanya gen TEM, SHV dan khususnya CTX-M pada isolate E. Coli penghasil ESBL di Makassar (Tauran P.M., 2015).

Peneliti memilih *Escherichia coli* sebagai organisme penghasil ESBL karena *Escherichia coli* merupakan salah satu spesies dari *Enterobacteriaceae* yang banyak ditemukan di RSUP Dr. Wahidin Sudirohudoso berdasarkan laporan pola kuman dan sensitivitas antibiotik tahun 2016.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ditemukan gen TEM pada *Escherichia coli* penghasil ESBL yang terdapat di Makassar ?
2. Apakah ditemukan gen SHV pada *Escherichia coli* penghasil ESBL yang terdapat di Makassar ?
3. Apakah ditemukan gen CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL yang terdapat di Makassar ?
4. Apakah ada hubungan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 dengan keberadaan gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.

5. Bagaimana karakteristik gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL terhadap tes sensitivitas antibiotik yang terdapat di Makassar ?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui adanya gen TEM, SHV dan CTX-M pada isolate *Escherichia coli* penghasil ESBL dan mengetahui hubungan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 dengan keberadaan gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar serta mengetahui karakteristik genetik *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.

2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui keberadaan gen TEM dari isolate *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.
- b. Untuk mengetahui keberadaan gen SHV dari isolate *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.
- c. Untuk mengetahui keberadaan gen CTX-M dari isolate *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.

- d. Untuk mengetahui karakteristik genetik (TEM, SHV dan CTX-M) *Escherichia coli* penghasil ESBL terhadap tes sensitivitas antibiotik yang terdapat di Makassar.
- e. Untuk mengetahui hubungan *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 dengan keberadaan gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.

D. Hipotesis

Gen TEM, SHV dan CTX-M ditemukan pada *Escherichia coli* penghasil *Extended spectrum β -lactamase* dan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 yang menentukan pola resistensi terhadap antibiotik tertentu sesuai dengan hasil PCR (gen TEM, SHV dan CTX-M) pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar.

E. Manfaat Penelitian

1. Pemeriksaan genetik melalui PCR dapat digunakan mendeteksi ada tidaknya ESBL yang dihasilkan oleh suatu bakteri sehingga dapat membantu klinisi dalam terapi pasien infeksi.

2. Deteksi ESBL yang cepat dan tepat melalui pemeriksaan PCR mempengaruhi kebijakan pemberian antibiotik sehingga dapat menurunkan morbiditas, mortalitas dan meringankan biaya perawatan.
3. Memberikan informasi genetik pada *isolate Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar.
4. Data penelitian dapat digunakan sebagai acuan studi epidemiologi yang dapat digunakan untuk mengontrol dan mengatasi wabah akibat infeksi kuman penghasil ESBL.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. ANTIBIOTIK

1. Definisi

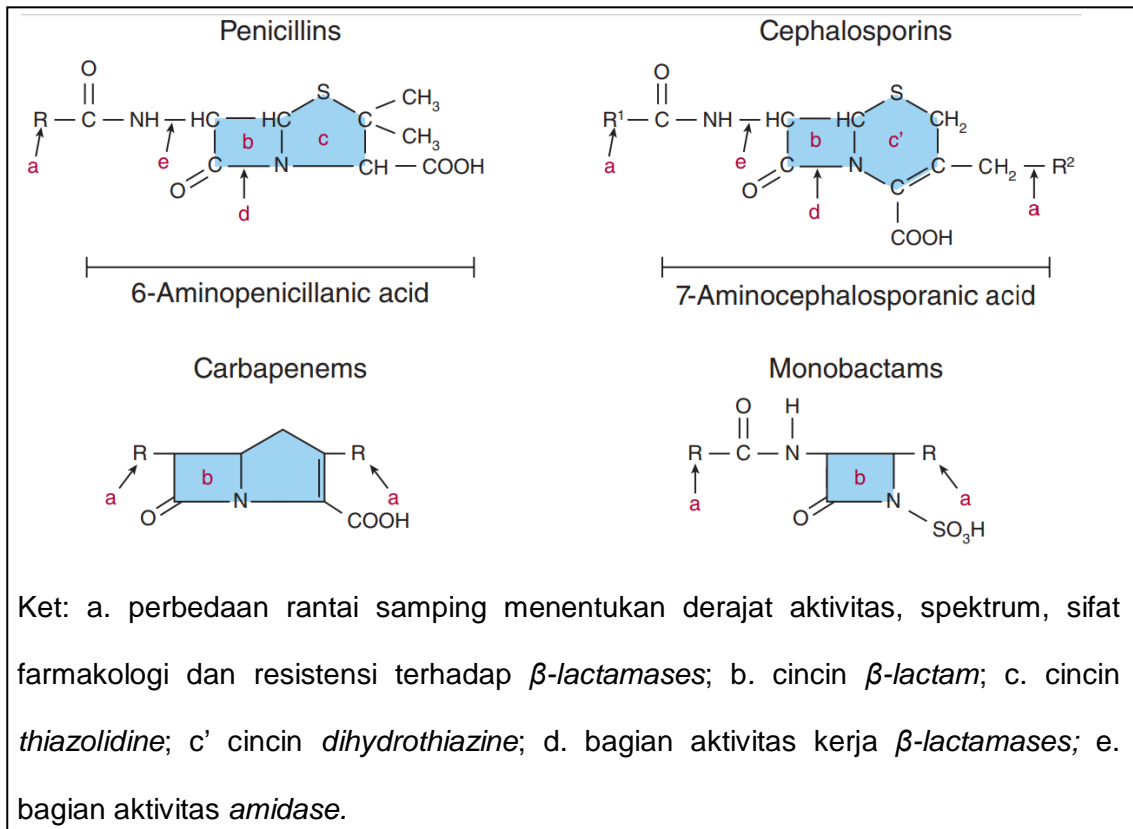
Antibiotik adalah substansi kimia yang dihasilkan dari berbagai macam spesies mikroorganisme atau diproduksi secara semisintesis dan sintesis untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme. Antibiotik berdasarkan strukturnya terdiri dari dua golongan yaitu *β -lactam* dan *non β -lactam*. Golongan *β -lactam* adalah golongan antibiotik yang sering digunakan di Indonesia. (Tjay dan Rahardja, 2007; biomeriaux, 2008).

2. Klasifikasi Antibiotik B-Laktam

Antibiotik *β -lactam* terdiri dari berbagai golongan obat yang mempunyai struktur cincin *β -lactam* yaitu memiliki struktur kimia yang tersusun tiga karbon dan satu struktur *nitrogen-cyclic amine*, sisi rantai lain berhubungan dengan cincin *β -lactam* menggambarkan variasi grup antibiotik dan melekat pada struktur inti melalui ikatan peptida (Gambar 1). Perbedaan sisi rantai ini berperan terhadap aktivitas antibiotik. Antibiotik golongan *β -lactam* terdiri dari lima kelas yaitu *penicillin*, *cephalosporin*, *carbapenem*, *monobactam* dan inhibitor *β -lactamase* (Tabel 1) (Yao, 2007; Permenkes 2011).

Tabel 1. Penggolongan antibiotik β -lactam berdasarkan Permenkes RI tahun 2011

Kelas	Sub Kelas	Nama Obat
<i>Penicillin</i>	<i>Penicillinase sensitif Penicillins</i>	<i>Penicillin G, penicillin V</i>
	<i>Penicillinase resisten penicillin</i>	<i>Nafcillin, cloxacillin, dicloxacillin, aminopenisilin</i>
	<i>Aminopenicillin</i>	<i>ampicillin, amoxicillin</i>
	<i>Penicillin anti- pseudomonas</i>	<i>carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, ticarcillin</i>
<i>Inhibitor β-lactamase</i>		<i>Asam clavulanate, sulbactam dan tazobactam</i>
<i>Monobactam</i>		<i>Aztreonam</i>
<i>Cephalosporin</i>	Generasi I	<i>Cephalexin, Cephalothin, Cephadroxil</i>
	Generasi II	<i>Cephachlor, cefamandol, Cephoxitin dan cephotetan</i>
	Generasi III	<i>Cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, sefiksim, cefoperazone, ceftizoxime dan cefpodoxime</i>
	Generasi IV	<i>Cefepime, cefpirome</i>
<i>Carbapenem</i>		<i>Imipenem, meropenem dan doripenem</i>



Gambar 1 . Struktur cincin β -lactam pada antibiotik golongan β -lactam (Ahmed Nafis et al., 2014)

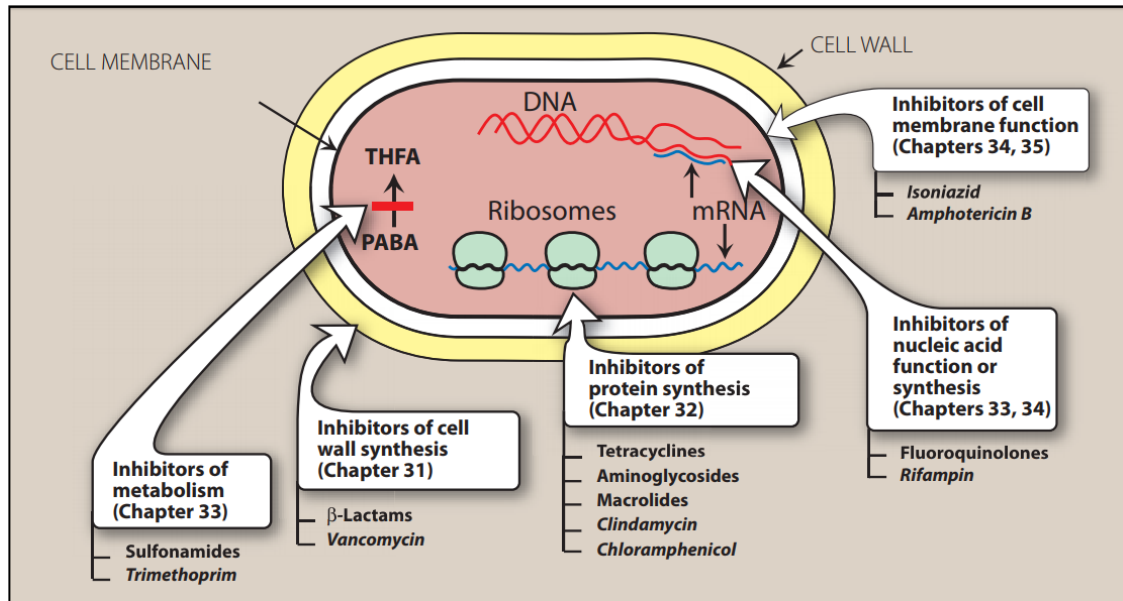
3. Mekanisme Resistensi Antibiotik

Lima mekanisme kerja antibiotik terhadap mikroorganisme diantaranya :
(Brooks G et al., 2103; Ansari Rais et al, 2012)

- Inhibisi sintesis protein, seperti aminoglikosid yang menghambat inisiasi protein sintesis dan ikatan terhadap subunit ribosom 30s.
- Menghambat sintesis atau fungsi asam nukleat, seperti pada quinolon menghambat sintesis DNA dengan mengganggu *topoisomerase*, DNA

gyrase dan *topoisomerase* tipe IV selama siklus replikasi menyebabkan pecahnya *double strand*.

- c. Menghambat jalur metabolisme, sulfonamide dan trimetoprim memblok kunci utama proses sintesis folat, yaitu kofaktor biosintesa nukleotida.
- d. Menghambat fungsi membran sel, ikatan antibiotik golongan lipopeptida *daptomycin* dan *polymixin* dengan membran sitoplasma sel bakteri menyebabkan disintegritas fungsional membran sitoplasma terganggu menyebabkan *efflux* ion dan makromolekul dari sel dan menyebabkan kerusakan dan kematian sel.
- e. Menghambat sintesis dinding sel, antibiotik beta laktam seperti *penicillin* dan *cephalosporin* bekerja dengan cara berikatan dengan reseptor *penicillin-binding protein* (PBP) yang merupakan enzim yang dibutuhkan untuk sintesis *peptidoglycan* (*glycosyltransferases*, *transpeptidases* dan *carboxypeptidases*). Ikatan antibiotik β -lactam dengan PBP menghambat sintesis *peptidoglycan* yang membentuk dinding sel bakteri sehingga menghentikan pertumbuhan bakteri (Rice LB, 2012).



Gambar 2. Mekanisme kerja antibiotik terhadap mikroorganisme (Sumber: Ansari Rais, 2012)

Resistensi terhadap antibiotik β -lactam menyebabkan bakteri terus berkembang biak dan memperberat infeksi. Mekanisme resistensi antibiotik β -lactam terdiri dari beberapa cara, namun mekanisme yang paling penting dan paling sering adalah produksi enzim β -lactamase yang dapat menghidrolisis antibiotik β -lactam (Drawz SM, 2010).

Extended-spectrum β -lactamase adalah enzim yang terdapat di dalam plasmid bakteri yang mampu menghidrolisis antibiotik golongan *penicillin*, *cephalosporin* generasi ketiga (*cefotaxime*, *ceftriaxone* dan *ceftazidime*) dan golongan monobactam (*aztreonam*) sehingga menyebabkan resistensi antibiotik tersebut pada bakteri penghasil ESBL. Bakteri penghasil ESBL dihambat oleh β -lactamase inhibitor (mis : asam klavulanat) dan tidak

terpengaruh oleh antibiotik golongan *cephamycins* (mis : *cefoxitin* dan *cefmetazole*) dan *carbapenem* (mis : meropenem dan imipenem); serta menunjukkan sensitifitas yang bervariasi terhadap antibiotik golongan aminoglikosida, fluoroquinolon dan trimethoprim-sulfamethoxazole (Paterson, D.L., 2005).

B. Escherichia Coli

1. Karakteristik

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi oleh dr Theodore escherich pada tahun 1885. *E. coli* termasuk genus *Escherichia* dan famili *Enterobacteriaceae*, yang awalnya merupakan bakteri komensal yang hidup di traktus gastrointestinal, yang kemudian dikenal menjadi patogen pada manusia yang menyebabkan infeksi traktus urinarius, traktus gastrointestinal dan sistem saraf pusat. Dapat dibedakan dua kelompok *E. Coli* yang pathogen yaitu, kelompok pertama adalah *Extraintestinal Pathogenis E.coli* (ExPEC) yang terdiri dari *E.Coli* yang menyebabkan *newborn meningitis* (NBM) atau sepsis dan infeksi saluran kemih (ISK), kedua adalah *Intestinal Pathogenic E.coli* (IPEC) yang menyebabkan penyakit diare. (Christopher L 2006, Mahon,C.R., 2016).

Strain *Escherichia coli* memiliki lebih dari 150 antigen O dan sejumlah antigen K dan H. Antigen O yang sebagian bereaksi silang dengan *Shigella*,

Salmonella dan *Klebsiella*. Antigen O terdiri dari pengulangan unit polisakarida dari lipopolisakarida (LPS) pada lapisan membran luar dinding sel. Sejumlah antigen K yang serupa dengan antigen Vi *Salmonella* yang memiliki peran penting dalam patogenesis dalam infeksi saluran kemih bagian atas. (Kenneth, J. R., 2014).

2. Morfologi Koloni dan sifat biakan *Escherichia coli*

Media selektif dan diferensial untuk *E. coli* adalah *MacConkey* (MAC) yang nampak sebagai koloni yang berwarna pink disekitar presipitasi garam empedu yang berbentuk halo. *E. coli* Memfermentasi glukosa, laktosa dan *xylose*, memproduksi indol dari tryptophan, *metil red* positif dan *voges proskauer* negatif. Tidak memproduksi H₂S, *DNase*, *urease* dan *phenylalanine deaminase* (Mahon, C.R., 2016).

C. *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL)

1. Definisi

β-lactamase adalah enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan 4-cincin *β-lactam* dari antibiotik golongan *β-lactam*. Pada tahun 1988 Jarlier et al awalnya menggunakan istilah "*extended broad spectrum beta-lactamases*" yaitu enzim yang memiliki aktivitas lebih luas dibandingkan dengan aktivitas *broad spectrum* dari enzim SHV dan TEM yang klasik yang

kemudian pada publikasi selanjutnya berubah menjadi *Extended-Spectrum Beta-lactamase* (Varaiya, 2008).

Extended spectrum beta lactamase (ESBL) adalah β -*lactamase* dengan kemampuan menghidrolisis penicillin, *oxymino cephalosporin*, dan *monobactam* yang dapat dihambat oleh inhibitor β -*lactam* seperti asam klavulanat, masih sensitif terhadap sefamisin (sefoksitin dan sefotetan) atau *carbapenem*. *Extended spectrum beta lactamase* dihasilkan sebagian besar oleh bakteri gram negatif dari famili *enterobacteriaceae*, terutama pada spesies *K. pneumonia* dan *E. coli* yang mempunyai kemampuan untuk menyebar dengan mudah di antara manusia dan dapat memperoleh materi genetik melalui transfer gen horizontal yang dimediasi oleh plasmid dan transposon. (Severin IJA 2010, CDC 2014)

2. Klasifikasi ESBL

Pada tahun 1980 Ambler menyusun klasifikasi molekuler atau filogenetik berdasarkan sekuensing asam amino yang menyusun β -*lactamase* dalam 2 kelas yaitu kelas A (*serine β -lactamases*) dan kelas B (*metallo β -lactamase s*). Jaurin dan Grundstrom pada tahun 1981 menambahkan kelas C yang memiliki *AmpC β -lactamases*. Pada tahun 1988, Houvinen menambahkan kelas D (*oxacillinases*). Bush K, Jacoby dan Medeiros (2010) mengklasifikasikan β -*lactamases* menjadi 3 kelompok berdasarkan inhibitor dan subtrak, setiap kelompok dibagi lagi menjadi subgroup berdasarkan perbedaan enzimnya (Kothari, 2008).

Tabel 2. Klasifikasi β -lactamases berdasarkan Bush Jacoby Medeiros dan Ambler

Grup dan subgroup	Kelas Molekuler Ambler	Subtrat	Inhibisi oleh		Enzim yang mewakili
			CA/TZ B	EDTA	
1	C	Cephalosporin	-	-	MIR-1, ACT-1 CMY-2, FOX-1
2a	A	Penicillins	+	-	PC1
2b	A	Penicillins, early cephalosporin	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	ESC, Monobactams	+	-	TEM-3, SHV-2, CTXM15, K1, PE R-1, VEB-1
2br	A	Penicillins	-	-	TEM-30, SHV-10
2c	A	Carbenicillin	+	-	PSE-, CARB-3
2d	D	Cloxacillin	±	-	OX-1, OXA-10
2de	D	ESC	±	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	±	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	ESC	+	-	CepA
2f	A	Carbapenems	±	-	KPC-2, IMI-1
3	B	Carbapenems	-	+	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1

CA : Clavulanic acid, TZB: tazobactam, ESC: Extended spectrum cephalosporin

Berdasarkan klasifikasi Ambler mayoritas ESBL termasuk dalam kelas A (*serine β -lactamases*) yang memiliki serin pada sisi aktifnya

Extended Spectrum β -Laktamases berdasarkan prevalensi genetiknya dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu tipe mayor dan minor. ESBL tipe mayor umumnya diekspresikan pada *isolate* klinis dan dideteksi pada banyak tempat di seluruh dunia, sedangkan tipe minor secara lokasi geografi jarang atau terbatas ditemukan. Tiga tipe mayor diantaranya TEM, SHV dan CTX-M (Bush K, 2010).

a. TEM (*Temoniera*)

TEM-1 pertama kali dilaporkan tahun 1965, berasal dari isolat *E. Coli* pada pasien wanita di Athena, Yunani yang bernama "*Temoniera*". Klasifikasi enzim β -lactamase yang dikode oleh TEM berdasarkan perbedaan perubahan kombinasi asam amino. TEM-1 β -lactamase (*blaTEM*) menimbulkan resistensi terhadap *ampicillin*, *penicillin* dan generasi pertama *cephalosporin* seperti *cephalotin* dan *cephaloridine*. Enzim ini berperan 90% dalam resistensi *ampicillin* pada *E. coli*, juga berperan pada resistensi penicillin pada *H. influenza* dan *Neisseria gonorrhoea*. *blaTEM* ditemukan pada *E.coli* dan *K. Pneumonia*, tapi dapat ditemukan pada bakteri gram negatif lainnya seperti *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morgagnii*, *Proteus mirabilis* dan *Salmonella* spp (Matthew, 1979).

TEM-2 turunan pertama TEM-1, *blaTEM* terjadi substitusi asam amino tunggal dari β -laktamase asli. 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. 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 ESBLs. Namun ESBLs 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 (Thenmozhi, 2014).

b. SHV (*Sulphydryl Variable*)

Tipe SHV-1 lactamase (*blaSHV-1*) pertama kali ditemukan pada *K. pneumonia* pada tahun 1972, yang merupakan enzim yang mengkode secara kromosomal resistensi terhadap *penicillin* dan generasi pertama *cephalosporin*. Perubahan pada *blaSHV-1* menimbulkan varian SHV dengan perubahan posisi struktur gennya. Kebanyakan varian SHV yang memiliki fenotip ESBL memiliki karakter khusus pada pertukaran asam amino dari serin ke glisin pada posisi 238. Sejumlah varian SHV-5 memiliki substitusi

lysine ke glutamate pada posisi 240. Residu serin diposisi 238 efisien menghidrolisis ceftazidime, dan residu lysine lebih efisien menghidrolisis cefotaxime. Ada 185 tipe SHV, hanya 25,4% yang merupakan ESBL dan termasuk subgroup 2be, 20% non ESBL masuk dalam subgroup 2b, 3,8 % merupakan tipe resistant inhibitor non-ESBL dan 94 yang belum bisa diklasifikasikan. SHV kebanyakan ditemukan pada *K. pneumonia* namun dapat pula ditemukan pada *Citrobacter diversus*, *E. Coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Sridar Rao 2015).

c. CTX-M (*Cefotaxime-Munich*)

Tahun 1988, ditemukan tipe baru ESBL yang dimediasi plasmid non TEM dan non SHV, didapatkan dari feses yang mengandung *E. coli*, memiliki tingkat hidrolisis yang kuat terhadap *cefotaxime* dan *ceftriaxone* tetapi tidak terhadap *ceftazidime* yang kemudian dinamakan FEC-1. Gen *bla*CTX-M kemungkinan dipindahkan dari kromosom bakteri yang spesiesnya berasal dari genus *Kluyvera*, yang secara berulang pindah ke plasmid yang diadaptasi oleh *E. Coli*. Tahun 1990 ditemukan tipe yang hampir sama pada strain *E. coli* yang berasal dari cairan eksudat telinga pada neonatus di Kota Munich, Jerman. Karena predomnan aktivitasnya terhadap *cefotaxim* dan berlokasi di Munich enzim ini dinamakan CTX-M (Chatterjee SS, 2010).

Seratus tiga puluh enam allel CTX-M telah diidentifikasi. Enzim yang dikode CTX-M ESBL dibagi berdasarkan homolog asam amino > 94% menjadi lima kelompok yaitu CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 dan

CTX-M-25. Grup CTX-M-1 terdiri dari CTX-M-1 dan beberapa varian lain seperti CTX-M-3 dan CTX-M-15. Grup CTX-M-2 terdiri dari CTX-M-2 dan beberapa varian lain. Grup CTX-M-8 terdiri dari CTX-M-8 dan varian lain. Grup CTX-M-9 terdiri dari CTX M -9 dan beberapa varian seperti CTX-M-14. CTX-M-25 terdiri dari CTX-M-25 dan varian lain. Berbeda dengan TEM dan SHV yang juga dapat mengekspresikan non ESBL, semua enzim CTX-M mengekspresikan fenotipe ESBL (Shakil S, 2010).

Aktivitas hidrolitik CTX-M-9 dan CTX-M-14 lebih tinggi (>1000 kali) terhadap *cefotaxime* dibandingkan *ceftazidim*. CTX-M-15 adalah tipe CTX-M ESBL yang pertama kali ditemukan memiliki aktivitas hidrolitik kuat terhadap *ceftazidim* yang dilaporkan di India. Selain CTX-M-15, CTX-M-16 dan CTX-M-27 memiliki aktivitas < 4 kali lebih aktif terhadap *ceftazidime* dibandingkan *cefotaxime* (Karim, 2001; Bonnet 2003; Chen Y 2005).

Penyebaran genotip ESBL tipe minor dihubungkan dengan wilayah geografi jarang ditemukan, dikarakteristikkan berdasarkan perbedaan geografisnya diantaranya (Naas T et al, 2008) :

- a. OXA (*Active on Oxacillin*), memiliki spektrum yang luas melawan aktivitas *oxymino-cephalosporin* atau *carbapenem*
- b. PER (*Pseudomonas aeruginosa*), bagian dari ESBL tipe PER hanya 25-27% yang homolog dengan tipe TEM dan SHV, memiliki kemampuan menghidrolisis *penicillin* dan *cephalosporin*, sensitif

terhadap inhibisi asam klavulanat. PER-1 pertama ditemukan pada strain *Pseudomonas aeruginosa* di Turki

- c. VEB (*Vietnam Extended Spectrum β -lactamase*), memiliki kemampuan resisten tingkat tinggi terhadap *ceftazidim*, *cefotaxim* dan aztreonam. VEB-1 pertama kali ditemukan di Vietnam.

3. Epidemiologi

Selama dua dekade terakhir terjadi peningkatan prevalensi resistensi tingkat tinggi terhadap antibiotik β -lactam yang disebabkan oleh *Enterobacteriaceae* akibat adanya enzim ESBL. Perbedaan pola resistensi yang terdapat pada tiap daerah menyebabkan perlunya epidemiologi lokal (negara, daerah, rumah sakit) secara periodik untuk membuat keputusan mengenai terapi empiris pada infeksi yang berat (Kanj SS, 2011).

Prevalensi *E. coli* tipe ESBL di Amerika utara pada tahun 2005 masih rendah sekitar 2-4%, meningkat menjadi 4,8% pada tahun 2007 dan menjadi 18,4% pada tahun 2012. Prevalensi di Eropa meningkat dari 14,4% pada tahun 2000 menjadi 19,6% tahun 2012. Pada daerah Asia pasifik dengan daerah yang beragam, prevalensi tahun 2013 sangat tinggi yaitu sebesar 48%, berbeda dengan daerah Australia ESBL-EC sebesar 12% pada tahun 2013. Data surveilans pada daerah timur tengah dan afrika meningkat secara bertahap dari 13% di tahun 2003 menjadi 16,2% pada tahun 2010 (Kaur, 2013; Oberoy L, 2013).

Pada tahun 2009 penelitian Asia-Pacific SMART melaporkan prevalensi ESBL dilaporkan 67,1% pada *E. Coli* dan 56,8% pada isolate *K. pneumonia* (Bora, 2014).

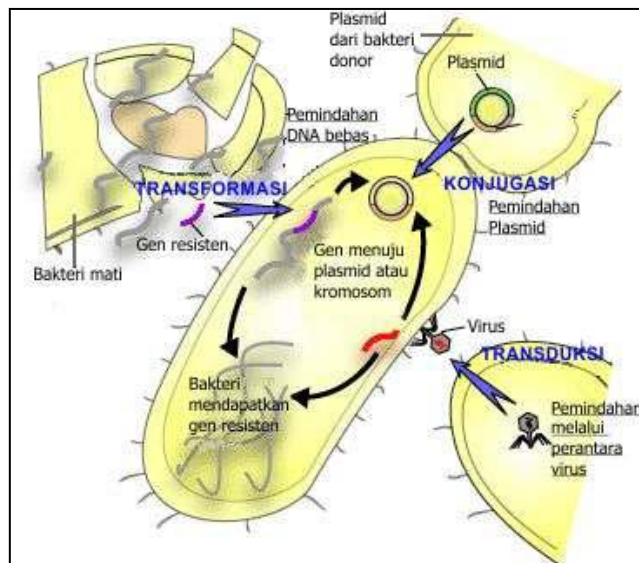
Insidens yang tinggi dari ESBL-EC ditemukan juga pada Negara berkembang, penelitian pada komunitas penduduk Thailand pada tahun 2010 menunjukkan 69,3% fekal karier pada individu asimtomatik mengandung *enterobacteriaceae* yang memproduksi ESBL tipe CTX-M (Nicholas Chanoine, 2013). Penelitian yang dilakukan Shu Xia dkk di Cina pada tahun 2011-2012 mendapatkan *E.Coli* merupakan pathogen utama yang ditemukan pada komunitas dengan Bla CTX-M-14 lebih dominan ditemukan dibanding CTX-M15 dan CTX-M-55 (Xia Shu, 2014).

Pada suatu surveilans mengenai organisme penghasil ESBL di RSUP Dr. Soetomo Surabaya Januari-November 2011 didapatkan *E.coli* penghasil ESBL yaitu 45,32% (329 dari 726 isolat) dan *K. pneumoniae* penghasil ESBL yaitu 50,28% (360 dari 716 isolat) (Hidayat B, 2011).

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh kelompok studi *Antimicrobial Resistance in Indonesia : Prevalence and Prevention* (AMRIN) di RSUP Dr. Soetomo Surabaya menemukan gen *bla*_{CTX-M-15} pada *E. coli* (94,5%) maupun *K.pneumoniae* (55,6%) penghasil ESBL sebagai tipe β -lactamase yang paling banyak ditemukan. (Severin JA, 2010).

4. Mekanisme resistensi

Mekanisme resistensi terhadap antibiotik dapat terjadi secara biokimia atau genetik. Secara biokimia resistensi dapat terjadi melalui inaktivasi antibiotik, modifikasi target, *efflux pumps* dan merubah permeabilitas dari outer membran. Aspek genetik dari resistensi adalah mutasi dan transfer genetik secara horizontal meliputi transformasi, transduksi, dan konjugasi. Transformasi terjadi saat bakteri mendapatkan DNA secara pasif dari bakteri sekitar yang telah mati. Transduksi merupakan pengambilan DNA dengan bantuan *bacteriophage* yang memindahkan DNA nya ke sel bakteri. Konjugasi merupakan pengambilan secara aktif fragmen dari DNA (plasmid) yang berisikan gen bakteri (Gambar 3) (Davies 2010).



Gambar 3. Transfer gen resisten secara horizontal (Sumber: Todar, 2011)

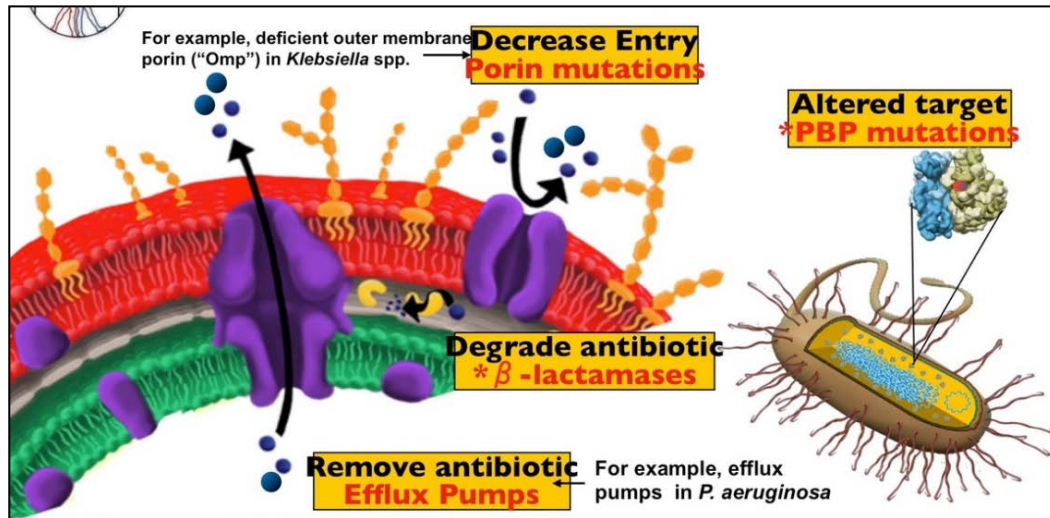
Mekanisme penyebaran resistensi antibiotik terdiri dari mekanisme intrinsik dan mekanisme didapat (*acquired*). Resistensi dengan mekanisme

intrinsik dipindahkan kepada keturunan mikroorganisme secara vertikal, sedangkan resistensi dengan mekanisme *acquired* disebabkan oleh DNA ekstrakromosom pada *mobile genetic element* yang didapat dan berpindah secara horizontal. Plasmid dan transposon merupakan *mobile genetic element* yang dapat menularkan faktor penentu atau gen resistensi (Mahon CR, 2011). Plasmid pembawa gen ESBL (TEM, SHV dan CTX-M) dapat berpindah antara strain pada spesies yang sama dan antara spesies yang berbeda. (Harada Y, 2013).

Mekanisme terjadinya resistensi oleh bakteri terhadap antibiotik

β-lactam terjadi melalui empat cara yaitu (Gambar 4):

- a. Perubahan *penicillin binding protein* (PBPs) menyebabkan lemahnya afinitas cincin *β-lactam* terhadap PBPs.
- b. Memiliki dinding sel yang tidak dapat dilalui oleh molekul antibiotik untuk penetrasi ke dalam sel bakteri yang disebabkan penurunan *ekspresi outer membrane proteins* (OMP).
- c. Mengaktifkan mekanisme “*efflux pumps*” terhadap antibiotik oleh sel menyebabkan bakteri mengeluarkan subtrak antibiotik dari periplasma ke luar sel.
- d. Memproduksi enzim *β-lactamase* yang menghidrolisis cincin *β-lactam* dan menginaktivasi *β-lactam* (Dierikx, 2013).



Gambar 4. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik β -lactam
(Sumber : Eckburg Paul, 2016)

D. Pemeriksaan Laboratorium ESBL

Peningkatan prevalensi *enterobacteriaceae* penghasil ESBL membutuhkan metode test laboratorium yang akurat untuk mengidentifikasi enzim pada isolate klinis. Tahun 2009 CLSI merekomendasikan metode untuk mendeteksi *enterobacteriaceae* penghasil ESBL melalui dua tahap yaitu tes skrining dan tes konfirmasi. Tahun 2010, CLSI merevisi pedoman dan interpretasi metode pendeteksian ESBL dalam dokumen M100-S20 yang menjelaskan bahwa tes ESBL yang rutin dilakukan tidak memerlukan waktu yang panjang untuk menghasilkan pelaporan resistensi terhadap *cephalosporin*, *aztreonam* dan *penicillin* untuk mengidentifikasi bakteri penghasil ESBL (CLSI 2010).

Pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk mendiagnosa ESBL diantaranya (Wang P, 2011):

1. Test skrining

Tes skrining bertujuan mendeteksi resistensi terhadap satu atau lebih *oxymino cephosporine* generasi ke-3 seperti *cefotaxime*, *ceftazidime*, *ceftriaxone*, *cefpodoxime* atau *aztreonam* menggunakan dua metode tes sensitivitas yaitu *microbroth dilution / MIC determination* dan *disc diffusion*. Kedua metode ini menggunakan antibiotik golongan *cephalosporin* generasi ketiga (tabel 2) (CLSI 2017).

Table 3: Interpretasi test skrining dengan metode disk diffusion dan MIC determination berdasarkan CLSI guidelines

Antibiotic	μg	Disk diffusion		MIC determination	
		<i>E. coli, K. pneumoniae & K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli, K. pneumoniae & K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>
aztreonam	30	≤ 27 mm	-	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$	-
ceftriaxone	30	≤ 25 mm	-	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$	-
ceftazidime	30	≤ 22 mm	≤ 22 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
cefotaxime	30	≤ 27 mm	≤ 27 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
cefpodoxime	10	≤ 17 mm	≤ 22 mm	≥ 8 $\mu\text{g/ml}$	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$

(Sumber : CLSI , 2107)

Jika hasil tes skrining mengindikasikan adanya produksi ESBL, maka perlu dilakukan tes konfirmasi untuk menegakkan diagnosis. Kelemahan dari

tes skrining bahwa proses yang dibutuhkan memerlukan penambahan biaya dan waktu yang lama untuk memberikan hasil. Sensitivitas tes tinggi dengan spesifitas yang rendah karena tes yang positif tidak hanya mengindikasikan produksi ESBL tetapi produksi β -lactamase yang lainnya juga dapat memberikan hasil positif (CLSI, 2017).

Nilai breakpoint MIC dari antibiotik pada test skrining bisa juga didapatkan dari *automated antibiotic susceptibility system* seperti VITEK-2 (Biomérieux Inc, 2008).

2. Metode konfirmasi fenotip

Test konfirmasi fenotip berdasarkan inhibisi invitro ESBL oleh asam klavulanat, *sulbactam* dan *tazobactam*. Inhibitor β lactamase terbanyak yang digunakan dalam metode konfirmasi fenotip adalah asam klavulanat. Beberapa metode yang direkomendasikan sebagai test konfirmasi diantaranya :

- a. Metode disk diffusion, pada tes ini isolate di swab kan pada permukaan *Mueller Hinton agar plate*. Disk *Ceftazidime* (30 μ g), *ceftazidime* + asam klavulanat (30/10 μ g), *cefotaxime* (30 μ g), *cefotaxime*+ asam klavulanat (30/10 μ g) ditempatkan pada *plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C. Tes konfirmasi menggunakan keduanya *cefotaxime* dan *ceftazidime* sendiri dan dikombinasikan dengan asam klavulanat. Peningkatan diameter zona ≥ 5 mm di sekitar disk dengan

asam klavulanat dibandingkan dengan *cephalosporin* sendiri mengkonfirmasi adanya produksi ESBL (CLSI 2017).

- b. Tes *microboth dilution*, tes ini menggunakan pengenceran *cefotaxime* dan *ceftazidime* yang berbeda-beda. Dilusi *cefotaxime* dan *ceftazidime* sendiri dan dikombinasikan dengan 4 µg/ml asam klavulanat. Pengenceran diantaranya *ceftazidime* 0,25-128 µg/ml, *ceftazidime*+asam klavulanat 0,25/4-128/4 µg/ml, *cefotaxime* 0,25-64 µg/ml dan *cefotaxime*+asam klavulanat 0,25/4-64/4 µg/ml. Penurunan MIC ≥ 3 , pada dua kali lipat pengenceran untuk *cephalosporin* dengan asam klavulanat dibandingkan dengan MIC pada *cephalosporin* sendiri mengkonfirmasi produksi ESBL. (CLSI, 2017; EUCAST 2102)

3. Sistem otomatis

Tes deteksi ESBL secara otomatis menggunakan alat Vitek 2 (*Biomerieux*), Microscan (*Siemens Medical Solution Diagnostic*) dan Phoenix (*BD Diagnostic Systems*). Pada Sistem Vitek 2, inokulum secara otomatis terisap mengisi sumur-sumur kecil yang mengandung antibiotik dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Kartu yang berisi sumur diinkubasikan pada suhu sesuai kompartemen alat, yang secara optik akan membaca setiap 15 menit. Sejumlah cahaya ditransmisikan pada setiap sumur, kemudian pertumbuhan setiap sumur diukur oleh sistem software menghasilkan data

MIC. MIC divalidasi dengan *software Advanced Expert System (AES)* dan menghasilkan pola resistensi antibiotik (*susceptible, intermediate* dan resisten. Kategori gram negatif yang memiliki β *lactamases* berdasarkan pola *susceptible* terhadap antibiotik golongan β *lactam* . Tes deteksi ESBL secara otomatis mendeteksi produksi ESBL dengan menggunakan ceftazidime atau cefotaxime sendiri dan berdasarkan inhibisi oleh inhibitor β *lactamases* seperti asam klavulanat, *sulbactam* dan *tazobactam* (BioMérieux Inc., 2008).

4. Teknik molekuler

Mendeteksi dan identifikasi ESBL secara langsung pada sampel klinik atau isolate dengan mendeteksi adanya primer oligonukleotida yang spesifik untuk *bla* gen. Sekuensing gen dan metode berbasis *DNA microarray* direkomendasikan selanjutnya untuk konfirmasi gen ESBL. PCR konvensional dilakukan dengan menggunakan metode *uniplex* atau *multiplex* (dapat mendeteksi multiple *bla* gen dalam waktu bersamaan dan dapat mengefisienkan biaya). Kelebihan PCR adalah hasil yang lebih cepat dengan sensitifitas yang tinggi dibandingkan kultur dengan kelemahannya karena memerlukan biaya yang mahal. (Naas T, 2013).

Revisi CLSI setelah tahun 2010 menentukan *breakpoint* sensitivitas beberapa *cephalosporin* dan *aztreonam* untuk *enterobacteriaceae* dan menghilangkan perlunya dilakukan tes skrining dan konfirmasi ESBL sebelum pelaporan hasil kecuali untuk kepentingan epidemiologi dan pengendalian

infeksi. Kriteria interpretasi yang sekarang dipakai adalah hasil (pedoman) standar tes sensitivitas antibiotik yang ditetapkan oleh CLSI sejak tahun 2010 hingga 2017 yaitu M100-S20 (Januari dan Juni 2010) sampai M100-S27 (Januari 2017) (CLSI, 2017).

Beberapa tes dengan metode rapid termasuk media kromogenik, sistem otomatis dan metode molekuler telah ditemukan untuk mengurangi waktu pelaporan dan peningkatan sensitifitas dan spesifitas deteksi ESBL.

Tes konfirmasi ESBL dapat menghasilkan positif palsu dan negatif palsu. *K. pneumonia* atau *E. coli* yang tidak menghasilkan ESBL tapi menghasilkan SHV-1 secara berlebihan dapat menyebabkan tes konfirmasi positif palsu. Isolat-isolat tersebut memiliki MIC ceftazidime $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ (Miro E, 1998, Rice LB, 2000). Wu dkk menemukan *outbreak* pada bangsal anak dengan isolat *K. pneumoniae* tanpa ESBL yang memiliki hasil tes konfirmasi positif. Bakteri tersebut menghasilkan TEM-1 dan SHV-1 dan hanya memiliki sedikit *outer membrane protein* OmpK35 (Wu TL, 2001).

Beberapa penelitian melaporkan adanya isolate *K. pneumoniae* yang memiliki tipe β -lactamase AmpC yang diperantarai plasmid. Beberapa organisme tersebut memiliki β -lactamase AmpC dan ESBL sekaligus. Keberadaan kedua jenis enzim tersebut secara bersamaan pada strain yang sama menyebabkan peningkatan MIC *cephalosporin* tetapi menghasilkan tes konfirmasi ESBL negatif palsu. Hal tersebut disebabkan β -lactamase AmpC

menahan hambatan oleh klavulanat dan oleh karena itu mengaburkan efek klavulanat dan *cephalosporin* terhadap ESBL (Paterson DL, 2005).

E. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction merupakan teknik penggandaan DNA yang ditemukan oleh Kary Mullis yang digunakan untuk sintesis dan penggandaan jumlah molekul DNA secara *in vitro* pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu relatif singkat (WHO 2011).

Prinsip kerja PCR yaitu satu molekul DNA digunakan sebagai cetakan untuk digandakan menghasilkan dua salinan, empat dan seterusnya yang dibantu oleh enzim DNA *polymerase*. DNA *polymerase* bekerja memperpanjang untai 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 untai DNA baru serta DNA cetakan. Jika ketiga bahan tersebut tersedia, maka pemanjangan DNA akan dilakukan oleh DNA *polymerase* (Joshi & Deshpande, 2010).

Proses sintesis dan penggandaan DNA menggunakan PCR terdiri dari 3 tahap yaitu (gambar 5):

1. Tahap denaturasi

Tahap denaturasi merupakan tahap pemisahan sebuah untai ganda DNA yang berlangsung pada suhu 94°C sehingga ikatan hidrogen antara untai DNA terpisah menjadi 2 buah untai tunggal DNA. Pemisahan ini menyebabkan DNA menjadi *template* (tempat menempelnya primer).

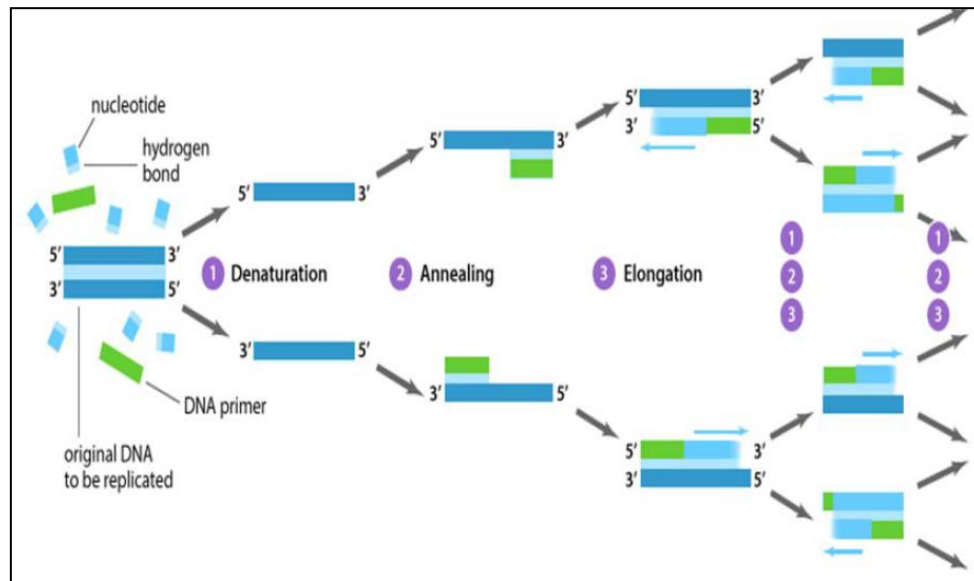
2. Tahap *annealing*

Tahap *annealing* merupakan tahap awal sintesis DNA secara invitro dimana primer menempel pada bagian *template* DNA. Suhu dan waktu yang diperlukan untuk proses ini tergantung dari komposisi dan panjang basa serta konsentrasi primer, tahap ini dilakukan pada suhu 40-60 °C, umumnya waktu yang dibutuhkan selama 1-2 menit. Turunnya suhu dapat mengakibatkan untai tunggal DNA cenderung bergabung dengan untai tunggal yang lain.

3. Tahap ekstension

Merupakan proses pemanjangan primer oleh DNA polimerase. Pada tahap ini DNA polimerase akan memasangkan dNTP yang sesuai pasangannya (pasangan A adalah T, C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim ini akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lamanya waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang

akan diamplifikasi. Suhu untuk proses ekstension tergantung jenis enzim DNA polymerase yang dipakai dan berlangsung pada kisaran suhu optimum kerja DNA polymerase yaitu 70-76 °C.



Gambar 5. Prinsip kerja Polymerase Chain Reaction (Applied Biological Material Inc, 2012)

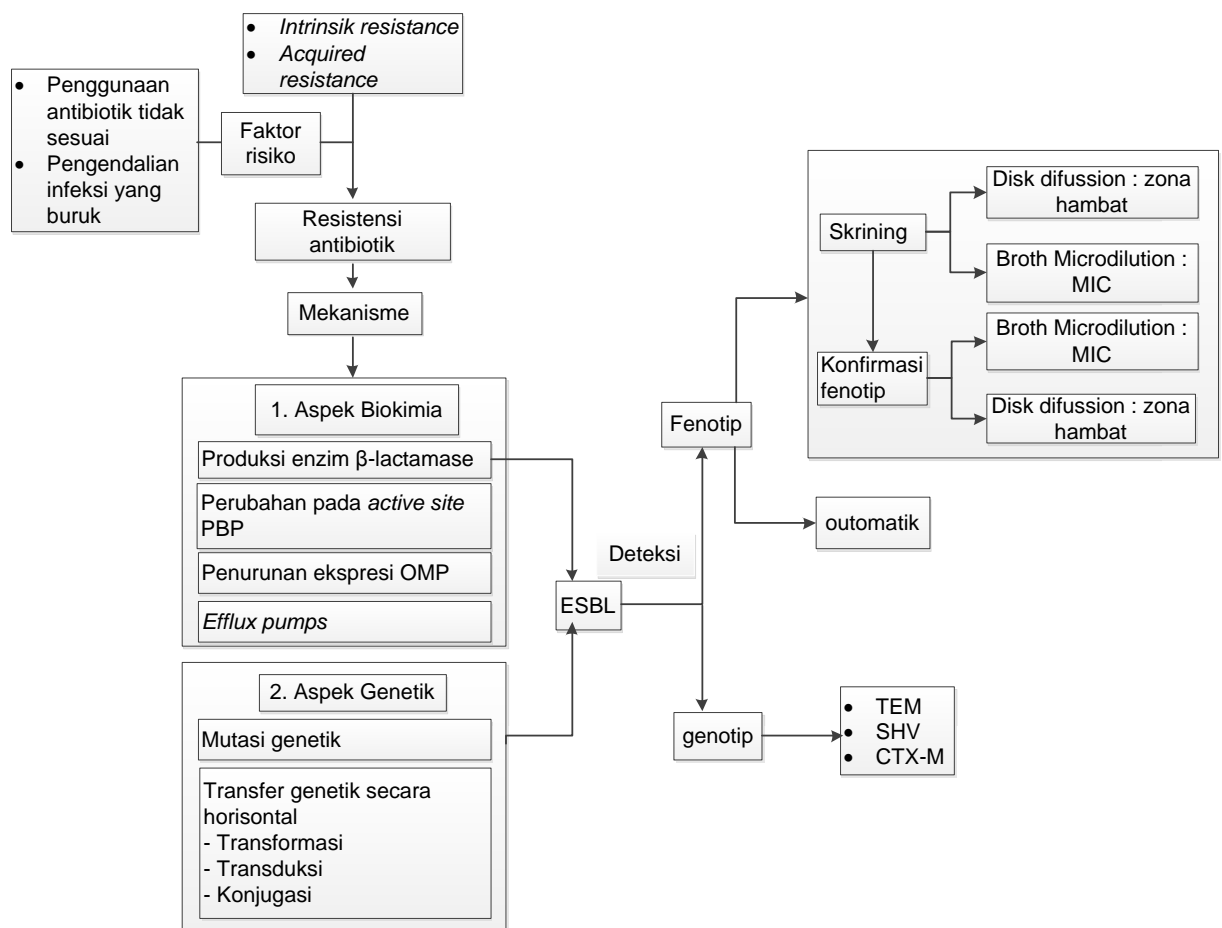
Tipe ESBL dapat diketahui melalui pemeriksaan genotip (molekuler) dengan PCR. Selain itu, deteksi molekuler juga dapat membantu menentukan *breakpoint* yang tepat (Walker L, 2010).

Pemeriksaan genotip ESBL dapat membantu memonitoring ESBL yaitu mengatasi kegagalan pengobatan dan berkontribusi penggunaan antibiotik yang sesuai dan kontrol infeksi. (Harada Yosuke, 2013).

BAB III

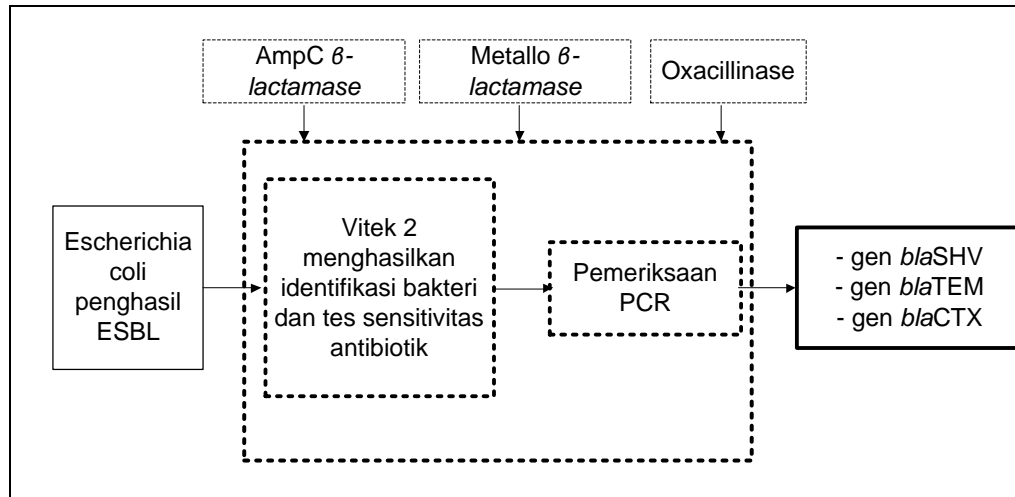
KERANGKA PENELITIAN

A. Kerangka Teori

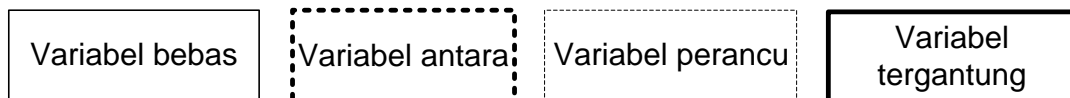


Keterangan : PBP = Penicillin Binding Protein, OMP = Outer Membrane Protein, ESBL = Extended Spectrum Beta Lactamase, MIC = Minimum Inhibitory Concentration, TEM=Temoniera, SHV=Sulphydril Variable, CTX-M=Cefotaxime Munich

B. Kerangka Konsep



Keterangan



BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dalam metode *cross sectional study*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Patologi Klinik sub Divisi infeksi tropis RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar.
- b. Unit Penelitian RSPTN Universitas Hasanuddin.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Januari 2018 sampai Februari 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah semua *isolate* hasil pemeriksaan kultur pasien rawat inap dan rawat jalan di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar yang disimpan sebagai bank kuman (arsip sampel).

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah semua isolat pada bank kuman dengan hasil identifikasi yaitu *Escherichia coli* dan hasil tes sensitivitas antibiotik yaitu ESBL positif dan ESBL negatif. Sampel diambil berdasarkan urutan masuknya ke laboratorium sampai jumlah sampel mencukupi.

3. Perkiraan Besar Sampel

Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus untuk penelitian

:

$$\begin{aligned}
 n &= \frac{Z\alpha^2 \text{sen}(1-\text{sen})}{d^2P} \\
 &= \frac{1,96^2 \times 0,95 \times 0,05}{0,1^2 \times 0,5} \\
 &= 26,1 \text{ dibulatkan menjadi } 27
 \end{aligned}$$

Keterangan :

n = besar sampel

Sen = sensitivitas yang diinginkan dari indeks, ditetapkan oleh peneliti, (95%)

d = presisi penelitian, ditetapkan oleh peneliti yaitu 10%

Z_{α} = derivat baku dari tingkat kesalahan (1,96)

P = prevalensi penyakit berdasarkan kepustakaan

Jumlah minimal sampel dalam penelitian ini adalah 27 sampel *E. coli* penghasil ESBL.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Sampel dari bank kuman dengan hasil tes identifikasi menggunakan alat otomatis yaitu *Escherichia coli*.
- b. Hasil tes sensitivitas antibiotik pada alat otomatis (Vitek® 2 Compact) yang menunjukkan fenotip ESBL berdasarkan CLSI M100-S27.

2. Kriteria Eksklusi

Sampel yang rusak, misalnya kering atau terkontaminasi.

E. Ijin Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan setelah dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar (KEPK FKUH-

RSPTN Universitas Hasanuddin-RSWS) serta atas seizin Direktur RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo dan Direktur RSPTN Universitas Hasanuddin.

F. Cara Kerja

1. Alokasi subjek

Penelitian dilakukan pada semua pemeriksaan kultur yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi di Laboratorium Patologi Klinik subdivisi Infeksi Tropis RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar.

2. Cara Penelitian

- a. Isolat bakteri *Escherichia coli* ESBL positif dan ESBL negatif diperoleh dari bank kuman (arsip sampel) Laboratorium Patologi Klinik sub Divisi Infeksi Tropis RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo. Isolat-isolat tersebut telah diidentifikasi menggunakan Vitek® 2 Compact dan disimpan dalam media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) sebagai arsip sampel.
- b. Koloni diambil dari TSIA kemudian disimpan di larutan NaCL 0,98% ditutup rapat dan disimpan pada freezer -80°C, yang akan digunakan untuk pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
- c. Setelah sampel disimpan sampai jumlah sampel mencukupi dan dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen ESBL

(TEM, SHV dan CTX-M) di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi, Bagian Mikrobiologi, FK UNHAS.

- d. Data yang dicatat meliputi nama, tanggal lahir, nomor rekam medik, jenis kelamin, tempat perawatan, nomor lab, spesimen dan pola resistensi antibiotik.

3. Tes Laboratorium

Pemeriksaan PCR

a. Pra Analitik

1). Persiapan sampel

Sampel berupa suspensi kuman yang telah disimpan pada suhu - 80°C.

2). Prinsip kerja

Prinsip kerja *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu melipat gandakan (amplifikasi) secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro*.

3). Alat dan bahan

Alat

- a) Sentrifus
- b) Rotator
- c) Mikropipet (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl) dan tip steril
- d) Microwave
- e) Alat PCR (Biorad)

- f) Alat elektroforesis
- g) *Waterbath*
- h) Kotak ultra violet
- i) Tabung eppendorf
- j) Tabung Erlenmeyer
- k) *Laminal flow*
- l) Gelas ukur
- m) BSC tipe II

Bahan

- a) L6 *lysis buffer*
- b) Silica
- c) L2 *washing buffer*
- d) Etanol 70 %
- e) Aseton 500 μ l
- f) TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH8)
- g) *Destiled water atau akuades baker*
- h) Taq DNA polymerase 2,5 U/ μ l
- i) dNTP 200 μ M
- j) MgCl₂ 1,5 μ M
- k) PCR buffer 10x
- l) Larutan oligonukleotida primer (Tabel 4)

- m) Agarose
- n) Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer 1x
- o) Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer 0,5x
- p) Etidium Bromida 5 µl
- q) *Loading dye*

Tabel 4. Urutan nukleotida pada oligonukleotida yang digunakan untuk amplifikasi PCR (Rodríguez-Baño J, 2008; Woodford N, 2004)

Primer	Urutan nukleotida (5' ke 3')
<i>bla</i> _{TEM}	1 : TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA 2 : ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT
<i>bla</i> _{SHV}	1 : ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG 2 : TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA
<i>bla</i> _{CTX-M}	1 : ATG TGC AGC ACC AGT AAA GTG ATG GC 2 : TGG GTA AAG TAA GTG ACC AGA ATC AGC GG

Catatan : 1 (*forward*) dan 2 (*reverse*)

b. Analitik

1). Ekstraksi DNA Escherichia coli penghasil ESBL

a). Preparasi sampel

Masukkan suspensi bakteri ke dalam tabung ependorf 1,5 ml kemudian sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 3.00 x g, setelah itu buang supernatant dan tambahkan 200 ul PBS serta 20 ul Proteinase K

b). *Cell lysis*

Tambahkan 200 µl GSB Buffer vortex, inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit dimana tiap 5 menit di vortex.

c). DNA Binding

Tambahkan 200 µl ethanol vortex selama 10 detik masukkan ke dalam GS Column dalam 2 ml *collection tube*, sentrifus 14.000-16.000 rpm selama 1 menit buang cairan pada *collection tube*.

d). Wash

Tambahkan 400 µl W1 Buffer, sentrifus 14.000-16.000 rpm selama 30 detik buang cairan pada *collection tube*. Tambahkan 600 µl wash buffer sentrifus 14.000-16.000 rpm selama 30 detik. Ganti *collection tube* dengan yang baru, sentrifus dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm selama 3 menit.

e). Elution

Pindahkan GS Column ke tabung ependorf steril, tambahkan 100 µl *elution buffer* yang sebelumnya telah dipanaskan. Sentrifus dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm selama 30 detik.

f). Buang GS Column cairan yang terdapat pada tabung ependorf merupakan DNA produk yang siap untuk di PCR.

2). Mix PCR

Mix PCR primer Multiplex yang terdiri dari :

a). Kappa Master Kappa Master Mix : 12,5 ul

b). Primer CTX - F : 0,5 ul

c). Primer CTX – R	: 0,5 ul
d). Primer TEM - F	: 0,5 ul
e). Primer TEM – R	: 0,5 ul
f). Primer SHV - F	: 0,5 ul
g). Primer SHV – R	: 0,5 ul
h). MgCl ₂	: 0,5 ul
i). Nuclesa Free Water	: 6,5 ul
j). DNA Sampel	: 5,0 ul
Total	: 25 ul

3). Run PCR

Primer SHV/TEM/CTX-M/uniplex PCR

Siklus 1 sebanyak 1x suhu 95°C selama 15 detik (pre-denaturasi)

Siklus 2 sebanyak x35 siklus

- Step 1 suhu 94°C selama 30 detik (proses denaturasi).
- Step 2 suhu 61°C selama 40 detik (proses aneling).
- Step 3 suhu 72°C selama 2 menit (proses *extension*)

Siklus 3 sebanyak 1x suhu 72°C selama 2 menit (*final extension*)

4). Gel elektroforesis

a). Buat gel :

- (1). Ditimbang 2 gr agarose dan di larutkan dalam 100 ml TAE buffer 0,5x untuk mendapatkan larutan agarose 2%.

- (2). Campuran agarose dan TBE buffer 0,5x, dipanaskan hingga larut kemudian ditunggu hingga agak dingin kemudian ditambah 5 μ l *ethidium bromide*.
- (3). Larutan agarose dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga beku.

b). Pembuatan DNA marker

- (1). Sebanyak 25 μ l DNA 100 bp ladder dimasukkan kedalam tube berisi 1 ml *Blue Juice Loading Dye*, dan dicampur untuk *marker*.
- (2). Label tube dicopot dan diganti menjadi marker.

c). Persiapan running elektroforesis

- (1). Gel yang telah beku dimasukkan ke dalam elektroforesis dan direndam dalam larutan TAE 0,5x.
- (2). Sebanyak 8 μ l amplicon hasil PCR (kontrol positif, control negative dan sampel ditambah dengan 2 μ l *blue juice loading dye* (tanpa marker), dicampur dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel sebanyak 10 μ l.
- (3). Pada lubang pertama tambahkan 10 μ l DNA leader 100 bp dimasukkan kedalam sumur di dekat kontrol positif.

d). Running elektroforesis

- (1). Elektroforesis dihidupkan dan dijalankan dari muatan negatif (katode) ke muatan positif (anode) pada 100 A dan 40 menit.
- (2). Setelah elektroforesis dilihat pita yang terbentuk, apabila pita sejajar dengan kontrol positif berarti hasil positif.

e). Prosedur kerja Gel Doc

Cara menggunakan alat Gel Doc dibagi menjadi 4 tahap, yaitu:

- (1) Menyalakan alat gel doc.

Menyalakan *gel doc* dengan menekan tombol ON pada bagian belakang sebelah kiri alat, kemudian menyalakan computer. Selanjutnya membuka *software Quantity one* dengan cara *double klik* pada icon *Quantity one*. Memilih *gel doc XR* dari menu file

- (2) Mengatur posisi gel.

Pintu alat *gel doc* dibuka, tekan tombol *epi white* (On) jika diperlukan/optional. Letakkan gel pada bagian tengah kemudian pintu alat ditutup. Iris, zoom dan focus diatur dengan melihat ke layar monitor pada *software quantity one*. Pintu alat dibuka kembali dan posisi gel diatur kembali jika diperlukan.

- (3) Mengatur gambar. Setelah pengaturan gel selesai, tekan tombol Trans UV (on, pada kondisi ini lampu UV akan mati secara otomatis apabila pintu dibuka kecuali tombol Hold

ditekan. Pilih *Auto Expose* apabila ingin mengambil gambar secara otomatis atau pilih manual expose apabila ingin mengambil gambar manual dengan menaikkan atau menurunkan waktu exposure (exposure time). Apabila gambar yang diinginkan sudah terlihat dengan baik dan jelas, klik *freeze*, untuk memberikan tulisan pada gambar, pilih *annotate*.

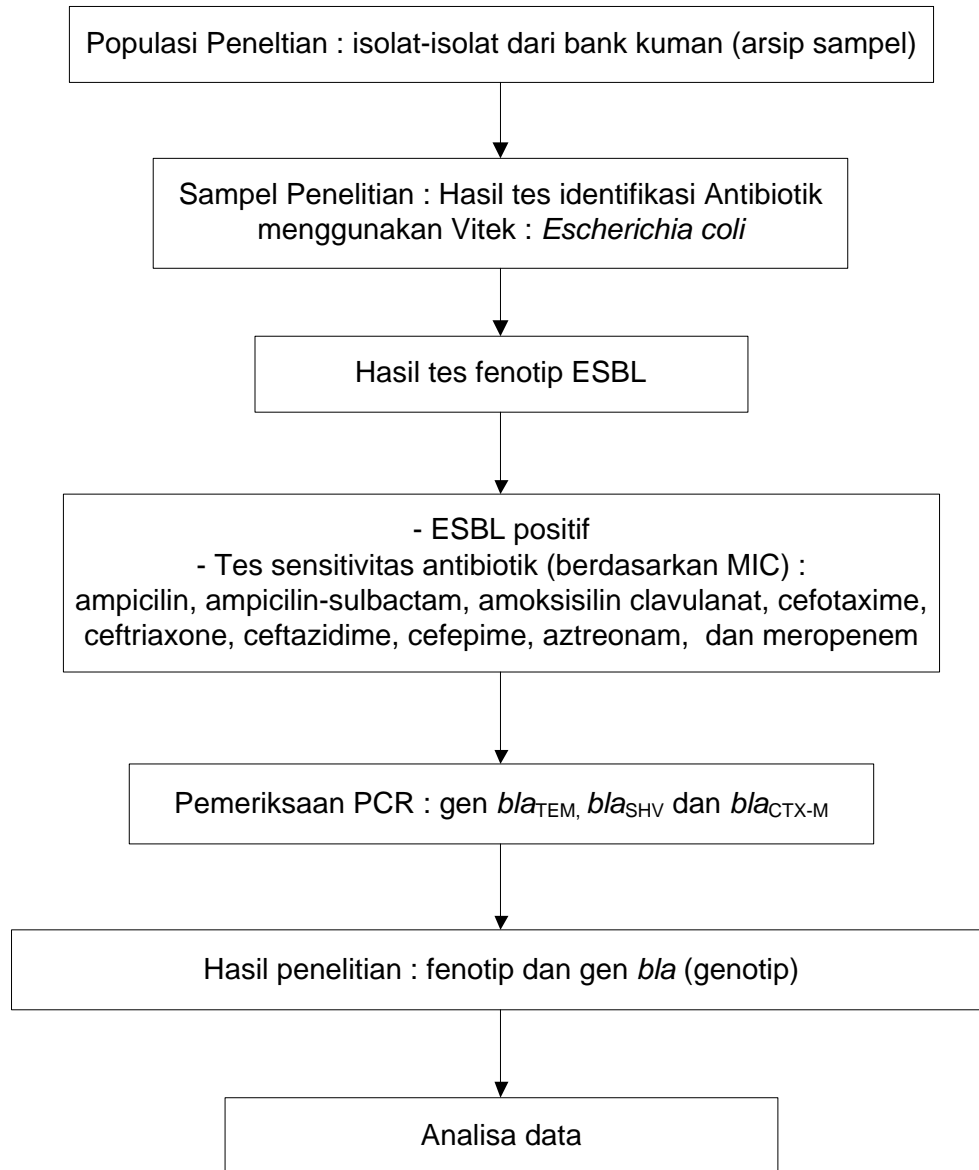
(4) Save dan print gambar. Setelah selesai di edit, kemudian gambar dapat di save dan kemudian klik Print untuk mendapatkan hasil dalam bentuk foto gel.

3) Pasca Analitik

Pembacaan hasil PCR

Pita (*band*) pada 445 bp untuk *bla_{TEM}*, 747 bp untuk *bla_{SHV}* dan 593 bp untuk *bla_{CTX-M}* di gel tersebut berarti sampel positif dan bila tidak tampak berarti sampel negatif.

G. Skema Alur Penelitian



H. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

1. *Escherichia coli* adalah basil gram negatif yang diidentifikasi menggunakan Vitek2 Compact.
2. *Extended-spectrum β -lactamase* adalah enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang menyebabkan resistensi antibiotik golongan *penicillin* (*ampicillin*), cephalosporin generasi ketiga (*cefotaxime*, *ceftriaxone* dan *ceftazidime*) dan golongan monobactam (*aztreonam*) namun sensitif pada antibiotik golongan kombinasi *β -lactam* dan inhibitor *β -lactam* (*ampicillin-sulbactam*), *cephamycin* (*cefmetazol*) dan *carbapenem*.
3. *Escherichia coli* penghasil ESBL adalah *Escherichia coli* yang menghasilkan *Extended-spectrum β -lactamase* yaitu enzim yang menghidrolisis antibiotik golongan *penicillin*, *cephalosporin* generasi ketiga (*cefotaxime*, *ceftriaxone* dan *ceftazidime*) dan golongan monobactam (*aztreonam*), tetapi dihambat oleh *β -lactamase inhibitor* (mis : asam klavulanat) dan tidak dihambat oleh antibiotik golongan *cephamycins* dan *carbapenems*, diidentifikasi dengan alat Vitek 2 Compact (Biomerieux, Perancis).
4. *Minimum Inhibitori Concentration* adalah konsentrasi terendah dari antibiotik atau antimikroba yang dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme, konsentrasi berdasarkan double dilusi diantaranya 0,35,

0,5, 1, 2, 4, 8 dan seterusnya, yang dihasilkan dari kultur mikroorganisme pada media cair atau pada plate media pertumbuhan padat.

5. Tes fenotip adalah tes yang menggunakan tes *susceptibilitas* terhadap antibiotik golongan β -*lactam* dengan interpretasi hasil berupa MIC dan menggunakan breakpoint berdasarkan CLSI untuk mendeteksi ESBL yang menggunakan Vitek2 Compact (Biomerieux, Perancis).

Tabel 5. Standar Interpretasi *Minimum Inhibitori Concentration Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017)

Antibiotik	Disk	Kriteria Interpretasi <i>Minimum Inhibitori Concentration</i> ($\mu\text{g/mL}$)		
		Susceptible	Intermediate	Resisten
<i>Ampicilin</i>	10 μg	≤ 8	16	≥ 32
<i>Amoxicillin-clavulanate</i>	20/10 μg	≤ 18	16/8	$\geq 32/16$
<i>Ceftriaxone</i>	30 μg	≤ 1	2	≥ 4
<i>Cefotaxime</i>	30 μg	≤ 1	2	≥ 4
<i>Ceftazidime</i>	30 μg	≤ 4	8	≥ 16
<i>Cefotetan</i>	30 μg	≤ 16	32	≥ 64
<i>Aztreonam</i>	30 μg	≤ 4	8	≥ 16
<i>Ampicilin-sulbactam</i>	10/10 μg	$\leq 8/4$	16/18	$\geq 32/16$
<i>Piperacilin tazobactam</i>	100/10 μg	$\leq 16/4$	32/4-64/4	$\geq 128/4$
<i>Cefepime</i>	30 μg	≤ 2	4 – 8	≥ 16
<i>Meropenem</i>	10 μg	≤ 1	2	≤ 4

6. Gen *bla*_{TEM} adalah gen TEM dengan panjang 445 bp yang mengkode resistensi terhadap antibiotik golongan *β-lactam* dengan menghasilkan enzim *β-lactamase* yang ditentukan dengan metode PCR menggunakan alat Biorad.
7. Gen *bla*_{SHV} adalah gen SHV dengan panjang 747 bp yang mengkode resistensi terhadap antibiotik golongan *β-lactam* dengan menghasilkan enzim *β-lactamase* yang ditentukan dengan metode PCR menggunakan alat Biorad.
8. Gen *bla*_{CTX-M} adalah gen (CTX-M) dengan panjang 593 bp yang mengkode resistensi terhadap antibiotik golongan *β-lactam* dengan menghasilkan enzim *β-lactamase* yang ditentukan dengan metode PCR menggunakan alat Biorad.
9. Kriteria status keluar pasien sembuh, membaik dan meninggal mengacu kepada data dari status rekam medis RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo berdasarkan gejala klinis dan respon pengobatan yang dinilai oleh klinisi di RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar.

I. Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dan disajikan dalam bentuk tabel, gambar dan narasi. Data diuji kesesuaiannya dengan *Independent Sampel T test*.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik Variabel Penelitian

Penelitian dilakukan selama periode Januari 2018 sampai Februari 2018 di Laboratorium Patologi Klinik sub Divisi Infeksi Tropis RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Unit Penelitian RSPTN Universitas Hasanuddin, Makassar. Didapatkan 42 sampel *E. coli* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan hasil tes fenotip ESBL positif.

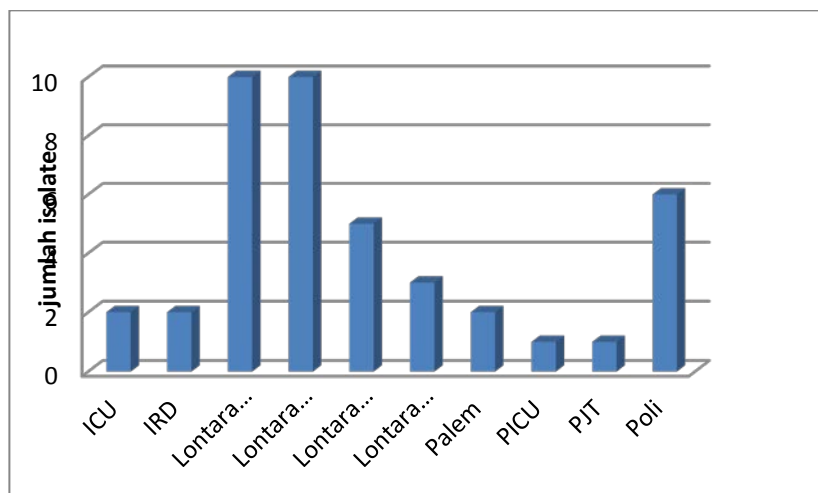
Escherichia coli penghasil ESBL ditemukan lebih banyak spesimen pasien laki-laki (64,3%) dengan kelompok usia terbanyak 41-60 tahun. Peneliti juga mengelompokkan berdasarkan jumlah alat kesehatan yang digunakan pasien yang dapat berupa infus, kanula dan masker oksigen, kateter urin, *nasogastric tube*, ventilator dan *Central Venous Catheter (CVC)*. Berdasarkan hal tersebut didapatkan isolat *Escherichia coli* penghasil ESBL paling tinggi pada penggunaan ≥ 4 alat (31%) (Tabel 1). Rerata lama rawat pasien penelitian ini adalah 24,9 hari.

Tabel 6. Karakteristik Sampel Penelitian

Variabel	n = 42	%
Jenis Kelamin		
Perempuan	15	35,7
Laki-laki	27	64,3
Umur (tahun)		
≤18	8	19
19-40	9	21,4
41-60	14	33,3
≥61	11	26,2
Jenis Isolat		
Pus	18	42,9
Urine	14	33,3
Feses	3	7,1
Sputum	6	14,3
Darah	1	2,4
Penggunaan alat kesehatan		
0-1	10	23,8
2	8	19
3	11	26,2
≥4	13	31
Jumlah jenis antibiotik yang digunakan selama perawatan		
0-1	6	14,3
2	11	26,2
3	13	31
≥4	12	28,6
Diagnosa		
Penyakit sistem pernapasan	7	16,7
Penyakit sistem genitourinaria	11	26,2
Penyakit sistem pencernaan	6	14,3
Neoplasma	6	14,3
Penyakit kulit dan subkutan	3	7,1
Penyakit endokrin, nutrisi & metabolik	4	9,5
Trauma, keracunan & kelainan eksternal	3	7,1
Penyakit Saraf	2	4,8
Status Keluar		
Sembuh	6	14,3
Membaik	28	66,7
Meninggal	8	19

Sumber: Data Primer

Diagnosa terbanyak ditemukan pada pasien penderita penyakit sistem genitourinaria (26,2%), dengan jenis isolat lebih banyak ditemukan pada pus dan urine . Riwayat penggunaan antibiotik 3 jenis lebih banyak ditemukan pada sampel penelitian, dengan diagnosa keluar terbanyak dalam keadaan membaik.



Gambar 6. Prevalensi *Escherichia coli* berdasarkan ruang perawatan

Isolate Escherichia coli penghasil ESBL lebih banyak berasal dari Lontara 2 (Perawatan Bedah) dan Lontara 1 (Perawatan Interna) (Gambar 6). Adanya sampel yang diperoleh dari poliklinik berasal dari pasien yang kontrol setelah rawat inap di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan rujukan dari rumah sakit lain.

Escherichia coli penghasil ESBL yang terdapat di Makassar memiliki gen TEM (40 dari 42 sampel), gen SHV (1 dari 42 sampel) dan gen CTX-M (didapatkan pada semua sampel). Kelompok *isolate* yang memiliki dua gen

(TEM dan CTX-M) didapatkan pada 39 sampel, kelompok *isolate* yang memiliki tiga gen (TEM, SHV dan CTX-M) terdapat pada 1 sampel dan gen CTX-M saja didapatkan pada 2 *isolate* (Tabel 7)

Tabel 7. Karakteristik Genetik E.coli penghasil ESBL

Variabel	n = 42	%
Berdasarkan jenis gen		
Gen TEM		
Positif	40	95,2
Negatif	2	4,8
Gen CTX-M		
Positif	42	100
Negatif	0	0
Gen SHV		
Positif	1	2,4
Negatif	41	97,6
Berdasarkan banyak gen		
Satu gen (CTX-M saja)	2	5
Dua gen (TEM dan CTX-M)	39	93
Tiga gen (TEM, CTX-M dan SHV)	1	2

Sumber: Data Primer

2. Karakteristik gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL terhadap tes sensitivitas antibiotik

Hasil analisis sensitivitas antibiotik menunjukkan antibiotik yang 100% resisten adalah *ampicillin*, *cefotaxime*, *ceftriaxone* dan *ceftazidime*. Antibiotik yang 100% sensitif adalah doripenem, meropenem dan amikacin. Diantara semua *Isolate* > 50% sensitif terhadap *imipenem* (97,6%), *cefoperazone sulbactam* (81%), *piperazilin tazobactam* (69%), *cefoxitin* (54,8%) dan *amoxicillin clavulanat* (52,4%). *Isolate* yang resisten \geq 50% terhadap *doxycycline* (52,4%) dan *gentamycin* (50%) (tabel 8).

Tabel 8. Karakteristik gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL terhadap tes sensitivitas antibiotik

Tes Sensitivitas Antibiotik	Gen TEM		Gen SHV		Gen CTX-M	
	Positif (n=40)%	Negatif (n=2)%	Positif (n=1)%	Negatif (n=41)%	Positif (n=42)%	Negatif (n=0)%
AMP : R	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	4(100)	0(0)
CZON : R I S	3(7,1)	1(2,4)	0(0)	4(9,5)	4(9,5)	0(0)
	4(9,5)	0(0)	0(0)	4(9,5)	4(9,5)	
	33(78,6)	1(2,4)	1(2,4)	33(78,6)	34(81)	
AMC : R I S	13(31)	1(2,4)	0(0)	14(33,3)	14(33,3)	0(0)
	6(14,3)	0(0)	0(0)	6(14,3)	6(14,3)	
	21 (50)	1(2,4)	1(2,4)	21(50)	22(52,4)	
TZP : R I S	10(23,8)	1(2,4)	0(0)	11(26,2)	11(26,2)	0(0)
	1(2,4)	0(0)	0(0)	2(4,8)	2 (4,8)	
	29(69)	1(2,4)	1(2,4)	28(66,6)	29 (69)	
FOX : R I S	13(31)	1(2,4)	0(0)	14(33,3)	14 (33,3)	0(0)
	5(11,9)	0(0)	0(0)	5 (11,9)	5 (11,9)	
	22(52,4)	1(2,4)	1(2,4)	22(52,4)	23(54,8)	
CTX : R	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	42(100)	0(0)
CAZ : R	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	42(100)	0(0)
CRO : R	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41 97,6)	42(100)	0(0)
DOR : S	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	42(100)	0(0)
IMI : R S	1(2,4)	0(0)	0(0)	1(2,4)	1(2,4)	0(0)
	39(92,9)	2(4,8)	1(2,4)	40(95,2)	41(97,6)	
MEM : S	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	42(100)	0(0)
AMK : S	40(95,2)	2(4,8)	1(2,4)	41(97,6)	42(100)	0(0)
GEN : R S	21(50)	0(0)	1(2,4)	20(47,6)	21(50)	0(0)
	19(45,2)	2(4,8)	0(0)	21(50)	21(50)	
TOB : R I S	11(26,2)	0(0)	0(0)	11(26,2)	11(26,2)	0(0)
	9(21,4)	1(2,4)	1(2,4)	9(21,4)	10(23,8)	
	20(47,6)	1(2,4)	0(0)	21(50)	21 (50)	
DOX : R I S	20(47,6)	2(4,8)	1(2,4)	21(50)	22(52,4)	0(0)
	6(14,3)	0(0)	0(0)	6(14,3)	6(14,3)	
	14(33,3)	0(0)	0(0)	14(33,3)	14(33,3)	

Ket: R: resistant, I:Intermediate, S: Susceptible, AMP : ampicillin, CZON:cefoperazon sulbactam, AMC: amoxicillin clavulanat, TZP: piperacillin tazobactam, FOX: cefoxitin, CTX:cefotaxime, CRO:ceftriaxone, DOR:doripenem, IMI:imipenem,

MEM:meropenem, AMK:amikacin, GEN:gentamicin, TOB:tobramycin, DOX:doxycyclin.

Keberadaan gen CTX-M mewakili keadaan seluruh sampel penelitian karena gen CTX-M ditemukan pada semua sampel penelitian.

Isolate yang memiliki gen TEM memiliki persentase resistensi lebih tinggi (>50%) terhadap *ampicillin* (95,2%), *cefotaxime* (95,2%), *ceftazidime* (95,2%) dan *ceftriaxone* (95,2%) dibandingkan pada *isolate* yang tidak ditemukan gen TEM. *Isolate* yang memiliki gen TEM memiliki persentase sensitivitas lebih tinggi (>50%) terhadap doripenem (95,2%), imipenem (92,9%), meropenem (95,2%), *amikacin* (95,2%), *cefoperazon sulbactam* (78,6%), *piperacillin tazobactam* (69%), *cefoxitin* (52,4%) dan *amoxicillin clavulanat* (50%) dibanding dengan *isolate* yang tidak memiliki gen TEM.

Isolate yang tidak memiliki gen SHV memiliki persentase resistensi lebih tinggi (>50%) terhadap *ampicillin* (97,6%), *cefotaxime* (97,6%), *ceftazidime* (97,6%) dan *ceftriaxone* (97,6%) dibandingkan pada *isolate* yang memiliki gen SHV. *Isolate* yang tidak memiliki gen SHV memiliki persentase sensitivitas lebih tinggi (>50%) terhadap doripenem (97,6%), imipenem (95,2%), meropenem (97,6%), *amikacin* (97,6%), *cefoperazon sulbactam* (78,6%), *piperacillin tazobactam* (66,6%), *cefoxitin* (52,4%) dan *amoxicillin clavulanat* (50%) dibanding dengan *isolate* yang memiliki gen SHV. Sementara karakteristik sensitivitas antibiotik gen CTX-M memiliki karakteristik yang sama dengan karakteristik semua sampel penelitian.

Tabel 9. Karakteristik E.coli penghasil ESBL pada kelompok 1 gen, kelompok 2 gen dan kelompok 3 gen terhadap tes sensitivitas antibiotik

Tes Sensitivitas Antibiotik		1 gen (n=2) (%)	2 gen (n=39) (%)	3 gen (n=1) (%)
<i>Ampicillin</i>	: Resisten	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Cefoperazone</i>	: Resisten	1 (2,4)	3 (7,1)	
<i>Sulbactam</i>	Intermediate		4 (9,5)	
	Sensitif	1 (2,4)	32 (76,2)	1 (2,4)
<i>Amoxicillin</i>	: Resisten	2(4,8)	13 (30,9)	
<i>Clavulanat</i>	Intermediate		6 (14,3)	
	Sensitif	1 (2,4)	20 (47,6)	1 (2,4)
<i>Piperacilin</i>	: Resisten	1 (2,4)	10 (23,8)	
<i>Tazobactam</i>	Intermediate	1 (2,4)	1 (2,4)	
	Sensitif		28 (66,6)	1 (2,4)
<i>Cefoxitin</i>	: Resisten	1 (2,4)	13 (30,9)	
	Intermediate		5 (11,9)	
	Sensitif	1 (2,4)	21 (50)	1 (2,4)
<i>Cefotaxim</i>	: Resisten	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Ceftazidime</i>	: Resisten	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Ceftriaxone</i>	: Resisten	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Doripenem</i>	: Sensitif	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Imipenem</i>	: Resisten		1 (2,4)	
	Sensitif	2 (4,8)	38 (90,5)	1 (2,4)
<i>Meropenem</i>	: Sensitif	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Amikacin</i>	: Sensitif	2 (4,8)	39 (92,8)	1 (2,4)
<i>Gentamicin</i>	: Resisten		20 (47,6)	1 (2,4)
	: Sensitif	2 (4,8)	19 (45,2)	
<i>Tobramisin</i>	: Resisten		11 (26,2)	
	Intermediate	1 (2,4)	8 (19)	1(2,4)
	Sensitif	1 (2,4)	20 (47,6)	
<i>Doxycyclin</i>	: Resisten	2 (4,8)	20 (47,6)	1 (2,4)
	Intermediate		6 (14,3)	
	Sensitif		13 (30,9)	

Sumber: Data Primer

Tabel 9 memperlihatkan bahwa di antara kelompok 1 gen, 2 gen dan 3 gen yang memiliki nilai resisten lebih tinggi terhadap *ampicillin* (92,8%), *ceftriaxone* (92,8%) , *ceftazidime* (92,8%), *cefotaxime* (92,8%), *doxycyclin* dan *gentamicyn* adalah kelompok dua gen, begitupun halnya dengan nilai sensitif lebih tinggi terhadap *doripenem* (92,8%), *meropenem* (92,8%), *imipenem* (90,5%), *cefoperazon sulbactam* (76,2%), *amoxicillin clavulanat* (47,6%), *piperacillin sulbactam* (66,6%), *cefoxitin* (50%) dan *amikacin* (92,8%) pada kelompok dengan dua gen.

3. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* CLSI M100-S27 dengan keberadaan gen TEM, SHV dan CTX-M pada *Escherichia coli* penghasil ESBL di Makassar

Hasil PCR gen TEM (Tabel 10) dibandingkan dengan nilai MIC masing-masing antibiotik dan didapatkan nilai MIC yang tidak berbeda bermakna antara ditemukan atau tidak ditemukannya gen TEM untuk semua antibiotik yang diuji ($p > 0,05$), sedangkan nilai MIC tertinggi pada *ceftazidim*, *cefotaxime* dan *ceftriaxone* sama yaitu 64.

Tabel 10. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* antibiotik pada gen TEM

Antibiotik	TEM								p*
	Positif (n=40)				Negatif (n=2)				
	Min	Maks	Mean	SD	Min	Maks	Mean	SD	
AMP	32	32	32,00	0,00	32	32	32,00	0,00	-
CZON	8	64	17,00	15,39	8	64	36,00	39,59	0,119
AMC	4	32	15,20	12,49	4	32	18,00	19,79	0,763
TZP	4	128	37,10	53,97	64	128	96,00	45,25	0,138
FOX	4	64	24,60	26,69	8	32	20,00	16,97	0,812
CTX	4	64	57,40	18,08	64	64	64,00	0,00	0,613
CAZ	1	64	25,03	24,93	4	64	34,00	42,42	0,630
CRO	2	64	59,70	15,40	64	64	64,00	0,00	0,698
DOR	0,12	0,12	0,12	0,00	0,12	0,12	0,12	0,00	-
IMI	0,12	16	0,64	2,49	0,25	0,25	0,25	0,00	0,826
MEM	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	0,25	0,2	0,00	-
AMK	2	16	4,70	5,07	2	2	2,00	0,00	0,461
GEN	1	16	8,88	7,58	1	1	1,00	0,00	0,155
TOB	1	16	7,10	6,14	1	8	4,50	4,95	0,561
DOX	0,5	16	10,15	6,78	16	16	16,00	0,00	0,236

Keterangan : * Independent sampel T Test, AMP : ampicillin, CZON:cefoperazon sulbactam, AMC: amoxicillin clavulanat, TZP: piperacillin tazobactam, FOX: cefoxitin, CTX:cefotaxime, CRO:ceftriaxone, DOR:doripenem, IMI:imipenem, MEM:meropenem, AMK:amikacin, GEN:gentamicin, TOB:tobramycin, DOX:doxycyclin

Sumber : data primer

Tabel 11. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* antibiotik pada gen CTX-M

Antibiotik	CTX-M (n=42)			
	Min	Maks	Mean	SD
AMP	32	32	32,00	0,00
CZON	8	64	17,90	16,74
AMC	4	32	15,33	12,58
TZP	4	128	39,90	54,61
FOX	4	64	24,38	26,19
CTX	4	64	57,71	17,69
CAZ	1	64	25,45	25,28
CRO	2	64	59,90	15,05
DOR	0,12	0,12	0,12	0,00
IMI	0,12	16	0,63	2,43
MEM	0,25	0,25	0,25	0,00
AMK	2	16	4,57	4,98
GEN	1	16	8,50	7,59
TOB	1	16	6,98	6,07
DOX	0,5	16	10,44	6,73

Keterangan : * Independent sampel T Test, AMP : ampicillin, CZON:cefoperazon sulbactam, AMC: amoxicillin clavulanat, TZP: piperacillin tazobactam, FOX: cefoxitin, CTX:cefotaxime, CRO:ceftriaxone, DOR:doripenem, IMI:imipenem, MEM:meropenem, AMK:amikacin, GEN:gentamicin, TOB:tobramycin, DOX:doxicyclin.

Sumber: data primer.

Hasil PCR gen SHV (Tabel 12) dibandingkan dengan nilai MIC masing-masing antibiotik dan didapatkan nilai MIC yang tidak berbeda bermakna antara ditemukan atau tidak ditemukannya gen SHV untuk semua antibiotik yang diuji ($p > 0,05$).

Tabel 12. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* antibiotik pada gen SHV

Antibiotik	SHV								
	Positif (n=1)				Negatif (n=41)				p*
	Min	Maks	Mean	SD	Min	Maks	Mean	SD	
AMP	32	32	32,00	-	32	32	32,00	0,00	-
CZON	16	16	16,00	-	8	64	17,95	16,95	0,910
AMC	4	4	4,00	-	4	32	15,61	12,61	0,369
TZP	4	4	4,00	-	4	128	40,78	54,99	0,513
FOX	4	4	4,00	-	4	64	24,88	26,31	0,438
CTX	64	64	64,00	-	4	64	57,56	17,88	0,724
CAZ	16	16	16,00	-	1	64	25,68	25,55	0,710
CRO	64	64	64,00	-	2	64	59,80	15,22	0,787
DOR	0,12	0,12	0,12	-	0,12	0,12	0,12	0,00	-
IMI	0,25	0,25	0,25	-	0,25	16	0,63	2,46	0,878
MEM	0,25	0,25	0,25	-	0,25	0,25	0,25	0,00	-
AMK	2	2	2,00	-	2	16	4,63	5,02	0,608
GEN	16	16	16,00	-	1	16	8,32	7,59	0,323
TOB	8	8	8,00	-	1	16	6,95	6,14	0,867
DOX	16	16	16,00	-	0,5	16	10,30	6,76	0,410

Keterangan : * Independent sampel T Test AMP : ampicillin, CZON:cefoperazon sulbactam, AMC: amoxicillin clavulanat, TZP: piperacillin tazobactam, FOX: cefoxitin, CTX:cefotaxime, CRO:ceftriaxone, DOR:doripenem, IMI:imipenem, MEM:meropenem, AMK:amikacin, GEN:gentamicin, TOB:tobramycin,DOX:doxycyclin

Sumber : data primer

Tabel 13. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* antibiotik berdasarkan jumlah gen

Antibiotik	Jumlah Gen											
	1 (n=2)				2 (n=39)				3 (n=1)			
	Min	Maks	Mean	SD	Min	Maks	Mean	SD	Min	Maks	Mean	SD
AMP	32	32	32,00	0,00 ^A	32	32	32	0,00 ^A	32	32	32,00	-
CZON	8	64	36,00	39,59	8	64	17,03	15,59	16	16	16,00	-
AMC	4	32	18,00	19,79	4	32	15,49	12,52	4	4	4,00	-
TZP	64	128	96,00	42,25	4	128	37,95	54,41	4	4	4,00	-
FOX	8	32	20,00	16,97	4	64	25,13	26,83	4	4	4,00	-
CTX	64	64	64	0,00 ^A	4	64	57,23	18,28	64	64	64,00	-
CAZ	4	64	34,00	42,42	1	64	57,23	18,28	16	16	16,00	-
CRO	64	64	64,00	0,00	2	64	25,26	25,22	64	64	64,00	-
DOR	0,12	0,12	0,12	0,00	0,12	0,12	0,12	0,00	0,12	0,12	0,12	-
IMP	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	16	0,65	2,52	0,25	0,25	0,25	-
MER	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	0,25	0,25	0,00 ^A	0,25	0,25	0,25	-
AMK	2	2	2,00	0,00	2	16	4,77	5,12	2	2	2,00	-
GEN	1	1	1,00	0,00	1	16	8,69	7,59	16	16	16,00	-
TOB	1	8	4,50	4,95	1	16	7,08	6,22	8	8	8,00	-
DOX	16	16	16,00	0,00	1	0,5	10,00	6,81	16	16	16,00	-

Keterangan : * Independent sampel T Test, AMP : ampicillin, CZON:cefoperazon sulbactam, AMC: amoxicillin clavulanat, TZP: piperacillin tazobactam, FOX: cefoxitin, CTX:cefotaxime, CRO:ceftriaxone, DOR:doripenem, IMI:imipenem, MEM:meropenem, AMK:amikacin, GEN:gentamycin, TOB:tobramycin, DOX:doxycyclin.Catatan: Nilai SD pada jumlah gen 3 tidak ada oleh karena sampelnya cuma satu saja.

Isolat *Escehrichia coli* penghasil ESBL yang memiliki satu gen (CTX-M) dengan nilai MIC sensitifitas antibiotik yang konstan adalah *ampicillin*,

cefotaxim, ceftriaxone, doripenem, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin dan *doxycyclin*. Isolate ESBL-EC yang memiliki dua gen (TEM, SHV dan CTX-M) dengan nilai MIC sensitifitas antibiotik yang konstan adalah *ampicillin, doripenem* dan *meropenem*. Nilai MIC tertinggi pada kelompok satu gen dan dua gen didapatkan pada *Piperacilin tazobactam* (MIC:128, SD: 53,97 mean:37,1) dan terendah pada imipenem (MIC :0,12, SD: 2,49, mean:0,64).

Analisis sensitivitas antibiotik dan nilai MIC diantara ketiga kelompok gen tidak dapat dilakukan karena jumlah sampel yang tidak merata sehingga tidak dapat mempresentasikan keadaan ketiga kelompok, keterbatasan sampel yang tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistik.

B. Pembahasan

Berdasarkan karakteristik subjek penderita *E.coli* penghasil ESBL lebih banyak ditemukan pada laki-laki, dengan kelompok umur terbanyak pada usia 41-60 tahun, diagnosa terbanyak ditemukan pada pasien penderita penyakit sistem genitourinaria (26,2%), dan ini sejalan bahwa *isolate* lebih banyak ditemukan pada urin (33,2%) dan pus (42,9%) (Tabel 6). Hal diatas hampir sejalan dengan penelitian dilakukan Yuwono di RSUD Moh Hosein, Palembang tahun 2011, penderita terbanyak ditemukan pada laki-laki (53,85%) dan terbanyak pada kelompok pasien dewasa. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan spektrum penyakit infeksi lebih banyak mengenai laki-laki. Yuwono juga menemukan spesimen terbanyak berasal, dari jenis *isolate* pus dan sputum. Sedangkan penelitian yang dilakukan Harada et all, di Rumah Sakit Universitas Nagasaki Jepang mulai tahun 2006-2010 menemukan *isolate E. coli* penghasil ESBL terbanyak di urine, disusul spesimen respiratori dan pus. *E.coli* merupakan penyebab utama infeksi saluran kemih di seluruh dunia, yang dilihat dengan pemeriksaan kultur bakteri pada urin. (Yuwono, 2011, Harada Yosuke, 2013)

Isolate ESBL-EC lebih banyak berasal dari Lontara 2 (Perawatan Bedah) dan Lontara 1 (Perawatan Interna) (Gambar 6), hal ini hampir sejalan dengan penelitian Yuwono yang menemukan spesimen terbanyak berasal dari perawatan interna. Perawatan interna merupakan tempat perawatan

penyakit yang sudah kronik dan membutuhkan waktu perawatan lama dan kompleks sedangkan perawatan bedah disebabkan karena masa pemulihan dari tindakan operatif yang dilakukan membutuhkan waktu yang lama. (Yuwono, 2011)

Hasil penelitian ini menunjukkan ESBL-EC paling tinggi pada penggunaan 3 alat (37,8%) yang dapat berupa infus, kateter urin, ventilator, *nasogastric tube* dan CVC (Tabel 6). Hal ini merupakan salah satu faktor risiko untuk mendapatkan infeksi. Pasien yang menggunakan banyak alat kesehatan biasanya pasien yang tingkat keparahan penyakit lebih tinggi dan memerlukan perawatan yang lebih lama. Rerata lama rawat adalah 24,9 hari, lama perawatan merupakan faktor risiko dan juga dapat menjadi akibat dari infeksi ini karena penanganan terapi yang lebih sulit sehingga *length of stay* memanjang. (Ahmad F, 2017)

Pada pemeriksaan PCR ditemukan bahwa gen pembawa sifat resistensi ESBL pada *Escherichia coli* yang paling banyak ditemukan di Rumah Sakit dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar yaitu gen CTX-M (didapatkan pada semua sampel), disusul oleh gen TEM (40 dari 42 sampel) dan gen SHV (1 dari 42 sampel) (Tabel 7). Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Patricia pada tempat yang sama di tahun 2015, yaitu didapatkan gen TEM (16 dari 32 sampel), gen SHV (6 dari 32 sampel) dan tidak ditemukan gen CTX-M15. Hal ini terjadi karena peneliti memilih gen CTX-M, dimana gen CTX-M dibagi berdasarkan homolog asam amino > 94% menjadi

lima grup utama yaitu CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 dan CTX-M-25 dengan lebih 170 varian. CTX-M15 merupakan varian dari CTX-M-1. Di seluruh dunia ESBL tipe CTX-M telah menggantikan posisi ESBL tipe TEM dan SHV, dan digambarkan sebagai fenomena "*CTX-M β -lactamase pandemic*". Untuk menentukan grup CTX-M yang dominan di populasi Makassar perlu dilakukan sekuensing gen dengan metode berbasis DNA microarray. (Tauran P, 2015)

Berdasarkan jumlah gen, dibagi atas tiga yaitu kelompok *isolate* yang memiliki dua gen (TEM dan CTX-M) didapatkan sebesar 93%, kelompok *isolate* yang memiliki tiga gen (TEM, SHV dan CTX-M) terdapat sebesar 2% dan gen CTX-M saja didapatkan 5% (Tabel 7), hal ini sejalan dengan penelitian Harada yang melaporkan bahwa setengah isolat E.coli penghasil ESBL memiliki 2 atau lebih gen ESBL. (Harada, 2013).

Hasil analisis sensitivitas antibiotik menunjukkan antibiotik yang 100% resisten adalah *ampicillin*, *amoxicillin*, *cefotaxime*, *ceftriaxone* dan *ceftazidime*. Antibiotik yang 100% sensitif adalah doripenem, meropenem dan amikacin. Diantara semua *Isolate* > 50% sensitif terhadap *imipenem* (97,6%), *cefoperazone sulbactam* (81%), *piperazilin tazobactam* (69%), *cefoxitin* (54,8%) dan *amoxicillin clavulanat* (52,4%). *Isolate* yang resisten \geq 50% terhadap *doxycycline* (52,4%) dan gentamycin (50%) (Tabel 8). Penelitian yang dilakukan oleh Sridar mendapatkan 100% resisten terhadap *aztreonam*, *ceftazidime*, *ceftriaxone* dan *cefotaxime*, sedangkan sensitivitas

terhadap beberapa kombinasi *cephalosporin* dengan inhibitor β -lactamase bervariasi. Sementara karakteristik dari ESBL memiliki kemampuan menghidrolisis *penicilin*, *oxymino sefalosporin*, dan monobaktam yang dapat dihambat oleh inhibitor beta-laktam seperti *clavulanat acid*, masih sensitif terhadap sefamisin (*cefoxitin* dan *cefotetan*) atau *carbapenem*. Adanya resistensi terhadap golongan inhibitor *beta lactamase* dapat disebabkan karena adanya *isolate* ESBL yang juga memiliki enzim *AmpC β -lactamase*, OXA-1 and KPC, yang menutupi efek inhibisi dari inhibitor β -lactamase terhadap ESBL. Penelitian oleh Sridar mendapatkan sekitar 5% ESBL-EC selain memiliki ESBL juga memiliki *AmpC β -lactamase* (*co-production* ESBL-*AmpC β -lactamase*). *Co -production* dapat disebabkan mutasi atau transfer genetik melalui plasmid. (Rao Sridar, 2015; Jacoby GA, 2009))

Resistensi ESBL-EC tidak hanya terjadi pada golongan *penicillin* dan *cephalosporin* generasi ketiga tetapi juga terjadi pada *doxycyclin* (52,4%) dan gentamycin (50%), artinya pada *isolate* ESBL-EC telah terjadi multidrug resistant, strain menjadi resisten terhadap antibiotik karena mereka dapat memindahkan gen ke strain yang lain. Gen penyebab resistensi terletak pada elemen genetik yaitu kromosom, plasmid, transposon dan integrin. Elemen genetik khususnya transposon, plasmid dan integron dapat bertukar bebas antara bakteri secara horizontal melalui proses konjugasi, transduksi dan transformasi. Proses ini menyebabkan terjadinya MDR pada beberapa antibiotik. ESBL termasuk *plasmid-mediated beta lactamase* yang dapat

menyebarkan secara horizontal melalui konjugatif plasmid dan integron. (Sridar Rao, 2015)

Pada semua penelitian ini didapatkan 54,8% *isolate* ESBL-EC sensitif terhadap *cefoxitin*, dengan angka resistensi sebesar 33,3%, hampir sama dengan penelitian yang dilakukan Sridar Rao dengan mendapatkan resistensi ESBL-EC 38,6% terhadap *cefoxitin*. *Cefoxitin* sebenarnya tidak dihidrolisis oleh ESBL, resistensi terhadap *cefoxitin* dapat disebabkan adanya *porin mutation* yang menyebabkan *cefoxitin* tidak bisa memasuki ruang periplasmik atau karena adanya *active efflux*. Hal ini masih memerlukan penelitian klinis untuk membuktikannya keefektifan *cefoxitin*. (Pages JM et al, 2009)

Pada semua *isolate* ESBL-EC didapatkan nilai sensitivitas terhadap imipenem sebesar (97,6%), berbeda halnya dengan antibiotik golongan *carbapenem* yang lain (*doripenem* dan *meropenem*) memiliki sensitivitas sebesar 100%, hal ini sama dengan hasil penelitian Sridar Rao yang mendapatkan 98,7% ESBL-EC sensitif terhadap imipenem. Kegagalan pengobatan infeksi ESBL-EC dengan *carbapenem* pernah dilaporkan, yang mungkin disebabkan seleksi *porin mutation* dan *co-production AmpC β -lactamase* atau enzim KPC. Sensitivitas ESBL-EC yang cukup tinggi terhadap golongan *carbapenem* menyebabkan golongan ini menjadi pilihan utama infeksi gram negatif yang memproduksi *β -lactamase*. (Rao Sridar, 2015; Kitchel B, 2010)

Isolate yang memiliki gen TEM memiliki persentase resistensi lebih tinggi (>50%) terhadap *ampicillin* (95,2%), *cefotaxime* (95,2%), *ceftazidime* (95,2%) dan *ceftriaxone* (95,2%) dibandingkan pada *isolate* yang tidak ditemukan gen TEM. *Isolate* yang memiliki gen TEM memiliki persentase sensitivitas lebih tinggi (>50%) terhadap *doripenem* (95,2%), *imipenem* (92,9%), *meropenem* (95,2%), *amikacin* (95,2%), *cefoperazon sulbactam* (78,6%), *piperacillin tazobactam* (69%), *cefoxitin* (52,4%) dan *amoxicillin clavulanat* (50%) dibanding dengan *isolate* yang tidak memiliki gen TEM (Tabel 8). Sensitivitas antibiotik pada ESBL-EC dengan gen TEM pada penelitian ini memiliki karakteristik yang sama dengan ESBL pada umumnya. TEM1 merupakan TEM yang pertama kali ditemukan pada kultur darah yang terinfeksi bakteri *E.coli* yang resisten terhadap ampicillin. TEM 2 ditemukan kemudian dengan sifat yang hampir sama dengan TEM1. TEM 3 merupakan varian pertama dari TEM yang merupakan TEM ESBL yang dapat menghidrolisis *extended spectrum cephalosporin*. Enzim yang dikode oleh gen TEM dengan fenotipe ESBL memiliki substitusi asam amino pada posisi 104, 164, 238 atau 240. Substitusi prominen ini diantaranya Glu104Lys, Arg164Ser, Arg164His, Gly238Ser dan Glu240Lys. Substitusi ini mengakibatkan perubahan spektrum hidrolisis dari enzim. Mutasi random pada *sequences* nukleotida dari bla gen bertanggung jawab terhadap substitusi tersebut. Mutasi ini dapat disebabkan salah satunya oleh pemakaian antibiotik yang lama. (Mathew, 1979; Gniadkowski M, 2008)

Isolate yang memiliki gen SHV menunjukkan pola resistensi dan sensitivitas yang sebaliknya dengan gen TEM. SHV-2 merupakan gen SHV tipe ESBL pertama yang ditemukan, yang memiliki substitusi asam amino tunggal Gly213Ser pada SHV-1 menyebabkan dapat menghidrolisis *extended spectrum beta lactamase*. Substitusi asam amino pada posisi 146, 156, 169, 179, 205, 238 atau 240 bertanggungjawab terhadap fenotipe enzim yang dikode gen SHV, namun dalam penelitian ini gen SHV tidak mewakili pola resistensi antibiotik pada ESBL-EC, hal ini bisa disebabkan karena jumlah sampel yang memiliki gen SHV positif hanya satu (2%) dari semua sampel, sehingga untuk melihat peranan gen SHV pada *isolate* ESBL-EC dalam menentukan resistensi terhadap golongan antibiotik tertentu memerlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak yang dapat mewakili sampel gen SHV. (Gniadkwocki M, 2008)

Isolate dengan dua gen (TEM dan CTX-M) memiliki jumlah yang resisten lebih tinggi terhadap *ampicillin* (92,8%), *ceftriaxone* (92,8%) , *ceftazidime* (92,8%), *cefotaxime* (92,8%), *doxycyclin* dan *gentamycin* dibandingkan dengan *isolate* yang memiliki satu gen (CTX-M) (Tabel 9). *Isolate* yang memiliki dua gen membawa sifat resistensi yang lebih tinggi dibandingkan yang memiliki satu gen karena efek kumulatif dalam kemampuan menghidrolisis golongan *oxymino cephalosporine* lebih kuat. Sedangkan kelompok *isolate* yang memiliki tiga gen memiliki jumlah yang resisten lebih rendah dibandingkan dengan *isolate* yang memiliki dua gen

(Tabel 9). Banyak sedikitnya gen yang dimiliki oleh ESBL-EC tidak mempengaruhi besarnya resistensi terhadap golongan *penicillin* dan golongan *cephalosporin* generasi ketiga. Hal ini dapat disebabkan karena persentase *isolate* yang memiliki dua gen sebesar 93% dibandingkan dengan kelompok tiga gen yang hanya sebesar 2% , sehingga untuk melihat lebih lanjut hubungan banyaknya gen yang dimiliki ESBL-EC dengan tingkat resistensi dengan antibiotik memerlukan sampel yang lebih banyak dengan distribusi sampel yang merata.

Pada perbandingan hasil PCR gen TEM dan SHV dengan nilai MIC masing-masing antibiotik didapatkan nilai MIC yang tidak berbeda bermakna pada keberadaan dari gen TEM dan gen SHV (Tabel 10 dan Tabel 12). Hasil ini mendukung bahwa hasil PCR tersebut tidak sesuai dengan hasil nilai MIC antibiotik berdasarkan CLSI M100-S27. Nilai MIC pada masing-masing antibiotik dalam menentukan pola kepekaan antibiotik berbeda-beda, sehingga tidak dapat dijadikan perbandingan keefektifan terapi antara antibiotik yang berbeda. (CLSI, 2017)

Nilai MIC tertinggi pada sampel penelitian ini terhadap *ceftazidim*, *cefotaxime* dan *ceftriaxone* sama yaitu 64(Tabel 10,11 dan Tabel 12). Berbeda halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Sridar Rao yang mendapatkan ESBL-EC memiliki nilai MIC *cefotaxime* dan *ceftriaxone* 16 kali lebih besar dibanding dengan MIC *Ceftazidime*, yang menandakan

predominan dari *cefotaximase* yang disandi oleh gen CTX-M. (Rao, Sridar, 2015)

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ditemukan gen TEM sebesar 95,2%, SHV sebesar 2,4%, dan gen CTX-M sebesar 100% pada isolat *Escherichia coli* penghasil Extended Beta Lactamase di RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar.
2. Nilai MIC antibiotik berdasarkan CLSI M100-S27 tidak sesuai dengan keberadaan gen TEM dan SHV.

B. Saran

Berdasarkan kesimpulan tersebut, disarankan perlunya penelitian lebih lanjut untuk melihat sub grup dari gen-gen penyandi ESBL yang ada di Makassar melalui Sekuensing gen dengan metode berbasis DNA microarray.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad Nafees, Lawrence W, Lagunoff Michael, Pottinger Paul, Barth L, Sterling C.R. 2014 *Antibacterial Agents and Resistance In Sherries Medical Microbiology*. Sixth edition, McGraw Hill education. New York;407-11)
- Alyamani Essam J, Khiyami Anamil M, Booq Rayan Y, Majrashi Majed A, Bahwerth Fayez S, Rechkina Elena. 2017. The Occurrence of ESBL-Producing Escherichia Coli Carrying Aminoglycoside Resistance Genes in Urinary Tract Infections In Saudi Arabia. *Ann Clin Microbial Antimicrob*. 16:1.
- Ahmad Fatmawaty. 2017. Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus. Departement Ilmu Patologi Klinik. Makassar
- Ansari Rais. Castejon,A.M., Cubeddu,L.X., Fuller Kathy, Gauthier Timothy, Gazze David et al. 2012. *Principles of Antimicrobial Therapy in Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Phildelphia. 369-80
- Applied Biological Materials (ABM) Inc. 2012. Polymerase Chain Reaction (PCR): An Introduction. ABM Inc, Canada, (Online), (<http://www.abmgood.com>), diakses 10 Oktober 2017.
- BioMérieux Inc., Customer Education. 2008. Vitek2 Antibiotic Classification and Modes of Action.
- Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G Substitution in a Novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:29-35.
- Bora A, Hazarika NK, Shukla SK, Prasad KN, Sarma JB, Ahmed G. 2014. Prevalence of blaTEM , blaSHV and blaCTX-M genes in Clinical Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from Northeast India. *Indian J Pathol Microbiol*. 57:249-54.

- Bradford PA.2001. Extended-Spectrum Beta Lactamases in The 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbial Rev.* 14:933-51.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse Stephen, Mietzner Timoty. 2103. Antimicrobial Chemotherapy in Medical Microbiology. 26th ed. McGraw Hill Companies. 371-75.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated Functional Classification of Beta Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:969-76.
- Canton R, Coque TM. 2006. The CTX-M Beta-lactamase Pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:466–475.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S Department of Health and Human Services. 2013. Antibiotic Resistance Threats in The United States.
- Chatterjee SS, Karmacharya R, Madhup SK, Gautam V, Das A, Ray P. 2010. High prevalence of Co-expression of Newer Beta-lactamases (ESBLs, Amp-C-betalactamases, and Metallo-beta-lactamases) in Gram-Negative Bacilli. *Indian J Med Microbiol.* 28:267-8.
- Chen Y, Delmas J, Sirot J, Shoichet B, Bonnet R. 2005. Atomic Resolution Structures of CTX-M Beta-lactamases: Extended Spectrum Activities from Increased Mobility and Decreased Stability. *J Mol Biol.* 348:349-62.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. CLSI document M100-S20 Vol 37 No 1. Wayne, PA. USA.CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Sevent Informational Supplement. CLSI document M100-S27 Vol 37 No 1. Wayne, PA. USA. CLSI..

- Davies J, Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance [ulas balik]. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74:417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- Eckburg Paul. 2016. The β -lactams: Part 1 Mechanism of Action and Resistance.(online).(<https://www.youtube.com/watch?v=oBmVHRuhm3A>). Diakses 20 Oktober 2017.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST). 2012. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance
- Gniadkowski M. Evolution of Extended-spectrum Beta lactamases by Mutation. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:11-32..
- Harada Yosuke, Morinaga Yoshitomo, Yamada Kolchi, Migiyama Yohei, Nagaoka Kentro et al. 2013. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta Lactamase Producing *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* in a Japanese.J *Med Microb Diagn.* 2:3
- Harris AD, Kotetishvili M, Shurland S, Johnson JA, Morris JG, et al. 2007. How Important is Patient-to-Patient Transmission in Extended-Spectrum Beta-Lactamase *Escherichia coli* Acquisition. *Am J Infect Control.* 35(2):97-101.
- Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, et al. 2012. Human-Associated Extended-Spectrum β -lactamase in The Antartic. *Appl Environ Microbiol.* 78:2056-8
- Herwana E, Yenny, Pudjadi L, Surjawidjaja JE, Lesmana M. 2008. Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Universa Medicina.* Vol.27 - No.3 : 98-105
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161-82.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated Extended Spectrum Beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and Gene Association with Insertion Sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201:237-41.

- Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic Factors Associated with Elevated Carbapenem Resistance in KPC producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4201-7.
- Kaur M, Aggarwal A. 2103. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India. *J Clin Diagn Res*. 7:642-5. 105.
- Kothari A, Sagar V. 2008. Antibiotic Resistance in Pathogens Causing Community Acquired Urinary Tract Infection in India: A Multicenter Study. *J Infect Dev Ctries*. 2:354-8.
- Matthew M. 1979. Plasmid Mediated Beta Lactamases of Gram Negative Bacteria Properties and Distribution. *J Antimicrob Chemother*. 5:349-58.
- Mahon CR, Walker Kimberly E, Lehman Donald, Manuselis George. 2105. *Enterobacteriaceae In Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. WB Saunders Elsevier Inc. 421-27
- Nicolas-Chanoine MH, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, et al. 2013. 10-Fold increase (2006–11) in The Rate of Healthy Subjects with Extended-Spectrum B-lactamase-Producing *Escherichia coli* Faecal Carriage in a Parisian Check-up Centre. *J Antimicrob Chemother*. 68: 562–568.
- Oberoi L, Singh N, Sharma P, Aggarwal A. 2013. ESBL, MBL and Ampc β Lactamases Producing Superbugs - Havoc in the Intensive Care Units of Punjab India. *J Clin Diagn Res*. 7:70-3.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor Extended Spectrum Beta Lactamases. *Clin Microbial Infect*. 14;42-52.
- Naas T, Cotellon G, Ergani A, Nordmann P. 2013. Real-time PCR for Detection of blaOXA-48 Genes from Stools. *J Antimicrob Chemotherapy*. 68:101-4. B, II

- Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, The Masked Side of Beta-lactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *PLoS One* 2009;4:e4817.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-Spectrum Beta-Lactamases : A Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4):657-86.
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. 2007. The Continuing Challenge of ESBL.
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406 / Menkes / PER/XII/2011. Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik Dengan Rahmat Tuhan Yang Maha Esa Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Pfaller MA, Segreti J. 2006. Overview of The Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum Beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 42 Suppl 4:S153-63.
- Prasetya, Y.A. 2014. Pola distribusi gen SHV, TEM dan CTX_M pada Isolate Klinis *Escherichia coli* Penghasil Extended Spectrum B-Laktamase dari Urin Pasien di RSUD dr. Soetomo Surabaya. Universitas Airlangga
- Ravikant, Kumar Parveen, Ranotkar swapnil, Zutshi Subharanshu, Lahkar Mangala, Phukan Chimanjita et al. 2016. Prevalence and Identification of Extended Spectrum B-Lactamase (ESBL) in *Escherichia coli* isolated from a tertiary care hospital in North-East India. 54: 108-114.
- Rao Sridar. 2015. Phenotypic and Genotype Characterization of Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated Across Karnataka. Departement of Microbiology, Sri Devaraj Urs Medical College.
- Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2008. Clinical Significance of Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6(5):671-83.
- Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, et al ;Study Group 'Antimicrobial Resistance in Indonesia: Prevalence and Prevention' (AMRIN). 2010. Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella*

pneumoniae isolates from Surabaya, Indonesia. *J Antimicrob Chemother.* 65(3):465-9.

Shaikh Sibhghatulla, Fatima Jamale, Shakil Shazi, Rizvi Syed MD, Kamal MA. 2015. Antibiotic Resistance and Extended Spectrum Beta-lactamases: Types, Epidemiology and Treatment in Saudi. *Journal of Biological Sciences.* 22, 90-101. Elsevier B.V.

Shakil S, Akram M, Ali SM, Khan AU. 2010. Acquisition of Extended-spectrum Betalactamase Producing *Escherichia coli* Strains in Male and Female Infants Admitted to a Neonatal Intensive Care Unit: Molecular Epidemiology and Analysis of Risk Factors. *J Med Microbiol.* 59:948-54.)

Tauran, P.M. 2015. Kesesuaian Zona Hambat Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S22 pada *Escherichia coli* penghasil Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) dengan gen TEM, SHV dan CTX-M15. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Todar K. 2011. Online Textbook of Bacteriology [Internet]. [diunduh 2015 Feb 22]. Tersedia pada: http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html.

Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. 2010. Detection of SHV-type Extended Spectrum β -lactamase in *Enterobacter* Isolates. *J Clin Microbiol.* 48:298-9.

Varaiya A, Dogra J, Kulkarni M, Bhalekar P. 2008. Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumonia* in Diabetic Foot Infection. *Indian J Med Microbiol.* 26:281-2

Wang P, Hu F, Xiong Z, Ye X, Zhu D, Wang YF, Wang M. 2011. Susceptibility of Extended-Spectrum-Beta-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* According to The New CLSI Breakpoints. *J Clin Microbiol.* 49(9):3127-31.

Woerther Paul Louis, Burdet Charles, Chachaty Elisabeth, Andremont Antoine. 2013. Trend in Human Fecal Carriage of Extended Spectrum β -Lactamases in The Community: Toward the Globalization of CTX-M In *Journals ASMorg.* P.744-758 Volume 26 Oktober 2013 No. 4.


World Health Organization (WHO). 2014. Antimicrobial Resistance : Global Report on Surveillance 2014.

World Health Organization Region Office for South East Asia. 2011. Establishment of PCR Laboratory in Developing Countries. India : World Health Organization.

Yao, J.D.C. and RC Moellering, Jr. 2007. Antibacterial Agents, in Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, edited by PR Murray et al., Washington D.C., ASM Press.

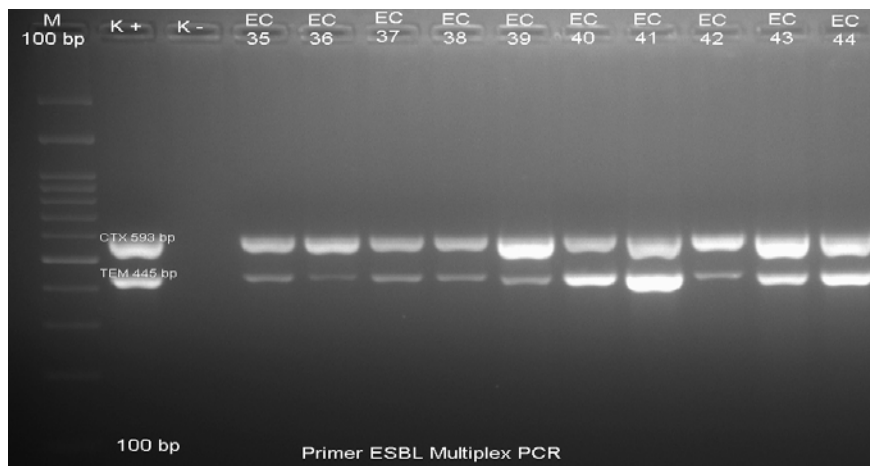
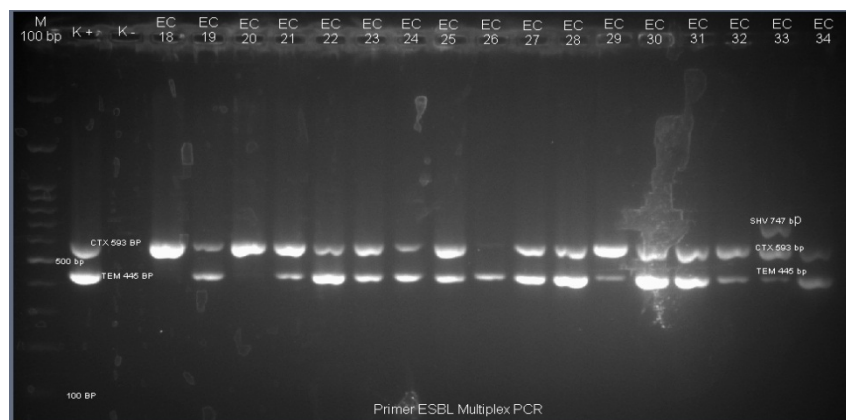
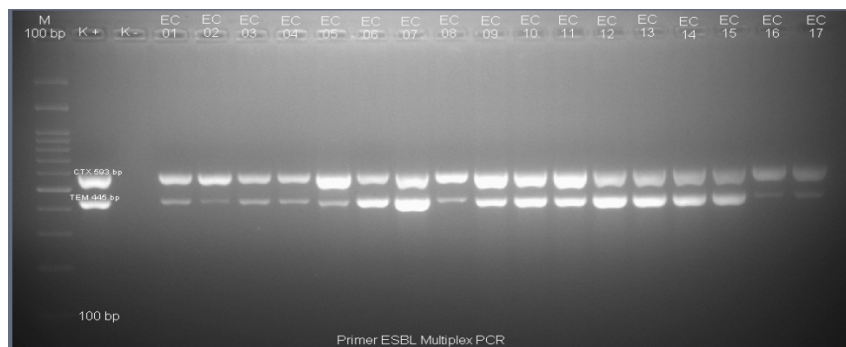
Yuwono. 2011. Prevalent Gen TEM pada Extended-Spectrum Beta Lactamase Producing Enterobacteriaceae. Departement of Microbiology Faculty of Medicine University of Sriwijaya.

Lampiran 1

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS HASANUDDIN FAKULTAS KEDOKTERAN RSPTN UNIVERSITAS HASANUDDIN RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245. Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK TELP. 081241850858, 0411.5780103, Fax: 0411-581431			
REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK			
Nomor: 6 / H4.8.4.5.31 / PP36-KOMETIK / 2018			
Tanggal: 3 Januari 2018			
Dengan ini Menyatakan bahwa Protokol dan Dokumen yang Berhubungan Dengan Protokol berikut ini telah mendapatkan Persetujuan Etik :			
No Protokol	UH170121055	No Sponsor Protokol	
Peneliti Utama	dr. Asriyani Azikin	Sponsor	Pribadi
Judul Peneliti	Analisis Gen Temoniera (TEM), Sulfhydryl Variable (SHV) dan Cefotaxime Munich (CTX-M) pada Isolat Escherichia Coli Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) di RSUP dr Wahidin Sudirohusodo Makassar		
No Versi Protokol	2	Tanggal Versi	29 Desember 2017
No Versi PSP	2	Tanggal Versi	29 Desember 2017
Tempat Penelitian	RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo dan RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar		
Dokumen Lain			
Jenis Review	<input type="checkbox"/> Exempted <input checked="" type="checkbox"/> Expedited <input type="checkbox"/> Fullboard Tanggal	Masa Berlaku	Frekuensi review lanjutan
		3 Januari 2018 sampai 3 Januari 2019	
Ketua Komisi Etik Penelitian	Nama Prof.Dr.dr. Suryani As'ad, M.Sc.,Sp.GK (K)	Tanda tangan	Tanggal
Sekretaris Komisi Etik Penelitian	Nama dr. Agussalim Bukhari, M.Med.,Ph.D.,Sp.GK (K)	Tanda tangan	Tanggal
Kewajiban Peneliti Utama: <ul style="list-style-type: none"> • Menyerahkan Amandemen Protokol untuk persetujuan sebelum di implementasikan • Menyerahkan Laporan SAE ke Komisi Etik dalam 24 jam dan dilengkapi dalam 7 hari dan Laporan SUSAR dalam 72 jam setelah Peneliti Utama menerima laporan • Menyerahkan Laporan Kemajuan (progress report) setiap 6 bulan untuk penelitian resiko tinggi dan setiap setahun untuk penelitian resiko rendah • Menyerahkan laporan akhir setelah Penelitian berakhir • Melaporkan penyimpangan dari protokol yang disetujui (protocol deviation / violation) • Mematuhi semua peraturan yang ditentukan 			

Lampiran 3

Hasil PCR dan elektroforesis isolate Escherichia coli penghasil ESBL



Lampiran 5

RIWAYAT HIDUP PENULIS

I. Data Pribadi

1. Nama : dr. Asriyani Azikin
2. Tempat/tanggal lahir : Sinjai, 31 Desember 1979
3. Alamat : BTP Blok AA, Jl Keindahan 2/51
4. Agama : Islam
5. Status : Kawin
6. Nomor Telepon : 081343595380
7. Alamat Email : asriyaniazikin@gmail.com
- 8.

II. Riwayat Pendidikan

1. SDN 1 Sinjai Utara, tahun, tahun 2002
2. SMPN 3 Sinjai Utara, tahun 2005
3. SMA 1 Sinjai, tahun 2008
4. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar Tahun 2004
5. Program Pendidikan Dokter Spesialis Program Studi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar (Mulai Juli 2014)

III. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter Umum : Puskesmas Borong Kompleks, Kabupten Sinjai, tahun 2005-2009
2. Dokter Umum : Puskesmas Balangnipa, Kabupaten Sinjai, tahun 2009-2010
3. Dokter umum RSUD Sinjai, Kabupaten Sinjai, tahun 2011- sekarang.

IV. Karya Ilmiah

1. Hubungan RNL dengan penurunan GFR pada nefropati Diabetik. Dibawakan pada MacPLAM 2016 di Makassar, Sulawesi Selatan dipublikasikan pada IJCP
2. Carcinoma Mammae pada anak perempuan umur 7 dengan CA 15-3 dan CEA dalam batas normal. Dibawakan pada PIT XIV PDS PATKLIN 2015 di Solo, Jawa Tengah
3. Karakteristik Pasien dengan Vancomycin Resistent Enterococcus (VRE) di RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar Dibawakan pada PIT XV PDS PATKLIN 2015 di Palembang, Sumatera Selatan