

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri komensal usus yang dapat bersifat patogen, bertindak sebagai penyebab utama morbiditas dan mortalitas diseluruh dunia (Tenailon *et al*, 2010).

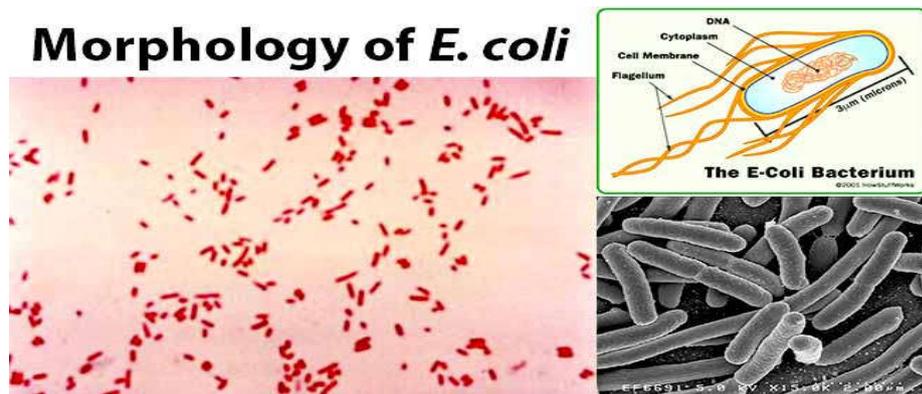
Escherichia coli merupakan kelompok *Enterobacteriaceae* yang paling banyak ditemukan menghasilkan ESBL. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek, berukuran 2,4 x 0,4-0,7 μm , bersifat *motil* dengan *flagella petrikus*, dan tidak berspora, serta termasuk patogen oportunistik yang selalu menunjukkan peningkatan resistensi terhadap berbagai antibiotik. Bakteri ini menduduki insidensi tertinggi penyebab *urinary tract infections* (UTI) (Yulianto, 2018).

2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi oleh dokter hewan Jerman, Theodor Escherich dalam studinya mengenai sistem pencernaan pada bayi hewan. Pada 1885, beliau menggambarkan organisme ini sebagai komunitas bakteri *coli*. Nama "*Bacterium coli*" sering digunakan sampai pada tahun 1991. Ketika Castellani dan Chalames menemukan genus *Escherichia coli* dan menyusun tipe spesies *Escherichia coli* (Jawetz, 2005).

Escherichia coli berasal dari anggota famili *Enterobacteriaceae*. Ukuran sel dengan panjang 2,0 - 6,0 μm dan lebar 1,1 - 1,5 μm . Bentuk sel dari bentuk seperti coccid hingga membentuk sepanjang ukuran filamentus, tidak ditemukan

spora. *Escherichia coli* merupakan bakteri batang Gram negatif. Selnya bisa terdapat tunggal, berpasangan, dan dalam rantai pendek, biasanya tidak berkapsul. Bakteri ini bersifat aerobik dan dapat juga bersifat aerobik fakultatif. *Escherichia coli* merupakan flora normal usus dan seringkali menyebabkan infeksi. Morfologi kapsula atau mikrokapsula terbuat dari asam-asam polisakarida. Mukoid kadang-kadang memproduksi pembuangan ekstraselular yang tidak lain adalah sebuah polisakarida dari spesifitas antigen K tertentu atau terdapat pada asam polisakarida yang dibentuk oleh banyak *Escherichia coli* seperti pada *Enterobacteriaceae*, selanjutnya digambarkan sebagai antigen M dan dikomposisikan oleh asam kolanik.



Gambar 2.1 Morphology *Escherichia coli* (Sumber dari microbenotes.com)

Bakteri *Escherichia coli* bergerak dengan flagella petrikus. *Escherichia coli* juga memproduksi macam-macam fimbria atau pili yang berbeda, banyak macamnya pada struktur dan spesifitas antigen, antara lain filamentus, proteinaceous. Fimbria merupakan rangkaian hidrofobik dan mempunyai pengaruh panas atau organ spesifik yang bersifat adhesi. Hal itu merupakan faktor virulensi yang penting. *Escherichia coli* merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemo organotropik, mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi tetapi pertumbuhannya paling banyak di bawah keadaan anaerob. Pertumbuhan yang baik pada

suhu optimal 37⁰C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber karbon dan nitrogen. *Escherichia coli* memfermentasikan laktosa dan memproduksi indol yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri pada makanan dan air. *Escherichia coli* berbentuk besar (2-3 mm), circular, konveks dan koloni tidak berpigmen pada nutrient dan media darah. *Escherichia coli* dapat bertahan hingga suhu 60⁰C selama 15 menit atau pada 55⁰C selama 60 menit (Bert.Howard C. 2004).

Klasifikasi Ilmiah *Escherichia coli* :

Kingom : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

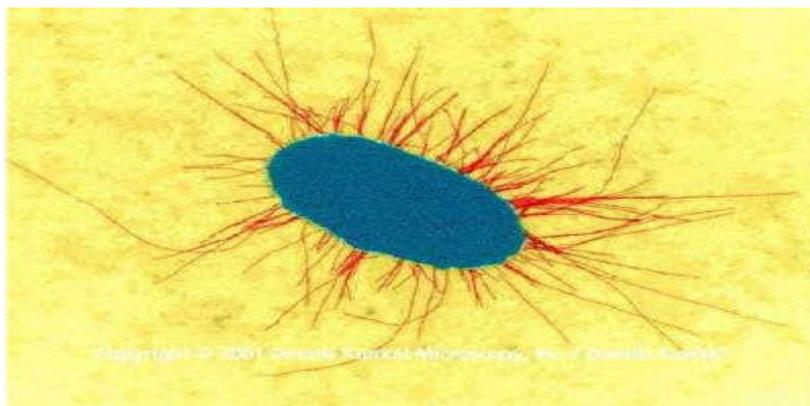
Class : *Gamma Proteobacteria*

Ordo : *Enterobacteriales*

Family : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli* (Hardjono, 2007)



Gambar 2.2 Bakteri *Escherichia coli* (Sumber Smith-Keary,1988)

2.1.2 Fisiologi dan Struktur Antigen *Escherichia coli*

Escherichia coli tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium Mikrobiologi; pada media yang dipergunakan untuk isolasi

bakteri enterik, sebagian besar *strain Escherichia coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *Escherichia coli* bersifat mikro aerofilik. Beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta (Agus dkk, 1994).

Beberapa tes biokimia yang dipakai untuk diagnostik bakteri *Escherichia coli*, yaitu :

Tabel 2.1 Test Biokimia bakteri *Escherichia coli* (Sumber Microbiology, edisi 18, th. 1984, hal. 604)

Tes Biokimia	Reaksi
Indol	+
Lisin dekarboksilase	±
Asetat	+
Peragian laktosa	+
Gas dari glukosa	+
Motilitas	±
Pigmen kuning	-

Escherichia coli secara khas memberi hasil positif pada test indol, lisin, dekarboksilase dan peragian manitol serta membentuk gas dari glukosa. *Escherichia coli* mempunyai antigen O, H, dan K. Pada saat ini telah ditemukan : 150 tipe antigen O, 90 tipe antigen K dan 50 tipe antigen H. pada *Escherichia coli* paling tidak terdapat 2 tipe fimbriae yaitu tipe manosa sensitif (pili), tipe manosa resisten (CFAs I&II). Kedua tipe fimbriae ini penting sebagai *Colonization factor*, yaitu untuk perlekatan sel bakteri pada sel/jaringan tuan rumah. Antigen kapsul K1 seringkali ditemukan pada *Escherichia coli*.

2.1.3 Patogenesis dan Gejala Klinik *Escherichia coli*

A. Patogenesis *Escherichia coli*

Di negara-negara berkembang *Escherichia coli* patogen menyebabkan lebih kurang seperempat dari seluruh kejadian diare. Transmisi bakteri ini

berlangsung secara *water borne* atau *food borne*. *Escherichia coli* ini diklasifikasikan oleh ciri khas sifat-sifat virulensinya dan setiap grup menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda, antara lain:

1. EPEC (*Entero Pathogenic Escherich*)

Merupakan *strain* pertama diantara *strain Escherichia coli* yang berhasil diidentifikasi sebagai penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC melekat pada sel mukosa yang kecil. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang biasanya sembuh sendiri tetapi dapat juga kronik.

2. ETEC (*Entero Toxigenic Escherichia coli*)

Merupakan penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan sangat penting menyebabkan diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Beberapa *strain* ETEC menghasilkan eksotosin tidak tahan panas.

3. EHEC (*Entero Haemorrhagic Escherichia coli*)

Merupakan *Escherichia coli* yang menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksinya pada sel vero, suatu sel hijau dari monyet hijau Afrika. Terdapat sedikitnya dua bentuk antigenik dari toksin. EHEC berhubungan dengan holitis hemoragik, bentuk diare yang berat dan dengan sindroma uremia hemolitik, suatu penyakit akibat gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikro angiopatik, dan trombositopenia.

4. EIEC (*Entero Invasive Escherichia coli*)

Menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan *shigellosis*. Penyakit terjadi sangat mirip dengan *shigellosis*. Penyakit sering terjadi pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju ke negara tersebut. EIEC

melakukan fermentasi laktosa dengan lambat dan tidak bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. Diare ini ditemukan hanya pada manusia.

5. EAEC (*Enterobacter Adherent Escherichia coli*)

EAEC (*Enterobacter Adherent Escherichia coli*), menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang. Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatnya pada sel manusia. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC.

Selain diare, *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan beberapa penyakit yang bisa juga disebabkan beberapa bakteri lain, antara penyakitnya sebagai berikut :

1. Infeksi saluran kemih

Penyebab yang paling lazim dari infeksi saluran kemih dan merupakan penyebab infeksi saluran kemih pertama pada kira-kira 90% wanita muda. Gejalanya yaitu sering kencing, disuria, hematuria, dan piuria. Kebanyakan infeksi ini disebabkan oleh *Escherichia coli* dengan sejumlah tipe antigen O. Infeksi saluran kemih terjadi akibat pertumbuhan bakteri yang terlalu banyak di saluran kemih. Gejala infeksi saluran kemih meliputi : Peningkatan rasa ingin berkemih, rasa terbakar saat berkemih, rasa gatal dan terbakar di bagian alat kelamin.

2. Sepsis

Bila pertahanan inang normal tidak mencukupi, *Escherichia coli* dapat memasuki aliran darah dan menyebabkan sepsis. Bayi yang baru lahir dapat sangat rentan terhadap sepsis karena tidak memiliki antibodi IgM. Sepsis dapat terjadi akibat infeksi saluran kemih. Infeksi bakteri yang menyebar di dalam darah

dapat menyebabkan sepsis, yang akan menyebabkan reaksi sistem imun yang berlebihan. Zat-zat kimia akan dilepaskan ke dalam darah sehingga menimbulkan respon peradangan di seluruh tubuh. Keadaan ini merupakan keadaan yang membahayakan nyawa dan dapat menyebabkan kegagalan organ serta kematian. Terjadinya sepsis akan memberikan gejala : Disorientasi atau tampak bingung, demam, menggigil, mual, muntah, kesulitan bernapas. Infeksi bakteri pada luka di kulit dapat menyebabkan bagian kulit tersebut menjadi berwarna merah dan bengkak. Cairan juga dapat keluar dari tempat luka.

3. Meningitis

Escherichia coli merupakan salah satu penyebab utama meningitis pada bayi. *Escherichia coli* dari kasus meningitis ini mempunyai antigen KI. Antigen ini bereaksi silang dengan polisakarida simpai golongan B dari *N meningitidis*. Mekanisme virulensi yang berhubungan dengan antigen KI tidak diketahui. Infeksi organ pernapasan yang disebut pneumonia terjadi ketika bakteri menginfeksi paru-paru dan saluran pernapasan. Beberapa gejala yang umumnya timbul adalah : Batuk, sering dengan mukus atau dahak yang kental, kesulitan bernapas, kelelahan, sesak, demam dan menggigil, berkeringat dan gemetar, mual dan muntah, diare, suhu tubuh yang rendah.

B. Patogenesis *Escherichia coli* Penghasil ESBL

Proses mekanisme perjalanan ESBL dari sampel urin karena adanya infeksi sekunder dalam hal ini infeksi saluran kemih (ISK) karena pada ISK bakteri oportunistik patogen menginvasi di dalam tubuh serta sudah resisten terhadap antibiotik selain golongan karbapenem. Apabila ISK tidak segera ditangani atau diterapi dengan antibiotik yang tidak sesuai, maka dapat menyebabkan kematian

karena bakteri sudah resisten terhadap antibiotik golongan sefalosporin penghasil ESBL. Pemeriksaan fenotipik tetap dilakukan untuk mengidentifikasi awal dari gejala klinis dari ISK, setelah itu dilanjutkan ke pemeriksaan secara genotipik karena tipe gen penghasil ESBL yang berbeda membutuhkan terapi antibiotik yang berbeda pula.

Kebanyakan infeksi ESBL disebarkan melalui kontak langsung dengan cairan tubuh orang yang terinfeksi (darah, cairan dari luka, air seni, atau dahak). Infeksi ini juga dapat disebarkan melalui benda atau permukaan yang telah terkontaminasi kuman. Terlebih lagi, seseorang dapat terkena infeksi ESBL dengan menyentuh air atau tanah yang terkontaminasi yang mengandung bakteri. Bersentuhan dengan hewan yang membawa bakteri juga dapat menyebarkan bakteri. Terdapat beberapa kelompok orang yang memiliki resiko lebih tinggi terkena infeksi ESBL yaitu: memiliki sistem imun yang lebih lemah, memiliki penyakit kronis seperti kanker dan diabetes, sudah pernah diobati dengan antibiotik sebelumnya, baru menjalani operasi, pernah tinggal di rumah sakit berulang kali atau untuk jangka waktu yang lama, dan memiliki luka terbuka.

C. Gejala Klinik *Escherichia coli*

Infeksi bakteri yang menyebar di dalam darah dapat menyebabkan sepsis, yang akan menyebabkan reaksi sistem imun yang berlebihan. Zat-zat kimia akan dilepaskan ke dalam darah sehingga menimbulkan respon peradangan di seluruh tubuh. Keadaan ini merupakan keadaan yang membahayakan nyawa dan dapat menyebabkan kegagalan organ serta kematian. Terjadinya sepsis akan memberikan gejala : Disorientasi atau tampak bingung, [demam](#), menggigil, mual, muntah, kesulitan bernapas. Infeksi bakteri pada luka di kulit dapat menyebabkan

bagian kulit tersebut menjadi berwarna merah dan bengkak. Cairan juga dapat keluar dari tempat luka. Infeksi organ pernapasan yang disebut pneumonia terjadi ketika bakteri menginfeksi paru-paru dan saluran pernapasan. Beberapa gejala yang umumnya timbul adalah : Batuk, sering dengan mukus atau dahak yang kental, kesulitan bernapas, kelelahan, sesak, demam dan menggigil, berkeringat dan gemetar, mual dan muntah, diare, suhu tubuh yang rendah. Infeksi saluran kemih terjadi akibat pertumbuhan bakteri yang terlalu banyak di saluran kemih. Gejala infeksi saluran kemih meliputi : Peningkatan rasa ingin berkemih, rasa terbakar saat berkemih, rasa gatal dan terbakar di bagian alat kelamin.

2.1.4 Diagnosis Laboratorium *Escherichia coli*

Untuk isolasi dan identifikasi kuman *Escherichia coli* dari bahan pemeriksaan klinik dipakai metode dan media sesuai dengan metode untuk bakteri enterik lain. Diagnosis laboratorium penyakit diare yang disebabkan *Escherichia coli* masih sulit dilakukan secara rutin, karena pemeriksaan secara tradisional dan serologi seringkali tidak mampu mendeteksi kuman penyebabnya. Deteksi sebagian besar strain *Escherichia coli* patogen memerlukan metode khusus untuk mengidentifikasi toksin yang dihasilkan. Beberapa metode baru berdasarkan tes imunologi dan teknik hibridasi DNA sudah dikembangkan.

2.1.5 Gen *Escherichia coli*

Urutan DNA lengkap pertama dari genom *Escherichia coli* (turunan strain K-12 derivatif MG1655) diterbitkan pada tahun 1997. Ini adalah molekul DNA bundar dengan panjang 4,6 juta pasangan basa , berisi 4288 gen penyandi protein beranotasi (diorganisasikan dalam 2584 operon), tujuh operon RNAribosom (rRNA), dan 86 transfer gen RNA (tRNA). Meskipun

telah menjadi subjek analisis genetik intensif selama sekitar 40 tahun, sejumlah besar gen ini sebelumnya tidak diketahui. Kepadatan pengkodean ditemukan sangat tinggi, dengan jarak rata-rata antara gen yang hanya 118 pasangan basa. Genom diamati mengandung sejumlah besar elemen genetik *transposable*, elemen berulang, *profag cryptic*, dan sisa *bakteriophage* (Blattner *et al*, 1997).

Lebih dari 300 rangkaian genom lengkap terdiri dari *spesies Escherichia* dan *Shigella* telah diketahui. Dan urutan genom dari jenis *strain Escherichia coli* telah ditambahkan ke koleksi ini sebelum 2014 (Meier *et al*, 2003). Perbandingan urutan ini menunjukkan keragaman yang luar biasa, hanya sekitar 20% dari masing-masing *genom* yang mewakili urutan yang ada di setiap satu isolat, sementara sekitar 80% dari masing-masing *genom* dapat bervariasi di antara isolat (Lukjancenko *et al*, 2010). Setiap *genom* individu mengandung antara 4.000 dan 5.500 gen, tetapi jumlah total gen yang berbeda diantara semua *strain* bakteri *Escherichia coli* diurutkan melebihi 16.000. Varietas komponen gen yang sangat besar ini telah diartikan sebagai dua pertiga dari gen *Escherichia coli* berasal dari spesies lain dan tiba-tiba melalui proses transfer gen horizontal (Blattner *et al*, 1997).

Gen dalam *Escherichia coli* biasanya dinamai dengan akronim 4 huruf yang berasal dari fungsinya dan dicetak miring. Misalnya, *recA* dinamai perannya dalam homolog *rec* pemakaian kombinasi ditambah huruf A. gen yang berhubungan fungsional diberi nama *recB*, *RECC*, *recd* dll protein diberi nama oleh akronim huruf besar, misalnya *RecA*, *recB*, dll Ketika genom *Escherichia coli* disekuensing, semua gen diberi nomor (kurang lebih) sesuai urutannya pada

genom dan disingkat dengan angka b, seperti b2819 (= *recD*). Nama "b" dibuat setelah Fred Blattner, yang memimpin upaya urutan *genom*. Sistem penomoran lain diperkenalkan dengan urutan jenis *Escherichia coli* lain, W3110, yang diurutkan di Jepang dan karenanya menggunakan angka yang dimulai oleh JW (Japanese W3110), misalnya JW2787 (= *recD*). Karenanya, *recD* = b2819 = JW2787. Namun, perlu diketahui bahwa sebagian besar database memiliki sistem penomoran mereka sendiri, misalnya database *Eco Gene* menggunakan EG10826 untuk *recD*. Akhirnya, nomor ECK secara khusus digunakan untuk *alel* dalam *strain* MG1655 dari *Escherichia coli* K-12. Daftar gen lengkap dan sinonimnya dapat diperoleh dari basis data seperti *EcoGene* atau *Uniprot* (Zhou J *et al*, 2013).

2.2 Antibiotika (β -Laktam)

Antibiotika merupakan substansi anti bakterial yang dihasilkan oleh berbagai spesies mikroorganisme (bakteri, fungi, dan *actinomycetes*) yang menekan pertumbuhan mikroorganisme lain. Penggunaannya seringkali memperluas sebutan "antibiotika" yang meliputi agen antimikrobal sintetis, seperti *sulfonamid* dan *quinolon*.

Antibiotika β -laktam merupakan agen mikroba yang sangat berguna dan sering diresepkan yang memiliki struktur dan mekanisme kerja yang sama, yaitu inhibisi dari sintesis dinding sel peptidoglikan bakteri. Golongan ini meliputi penicillin G dan V, nafcillin, ampicillin, piperacillin, sefalosporin, klavulanat, dan karbapenem. Antibiotika β -laktam juga mencakup antibiotika sefalosporin, yang digolongkan dengan generasi, yaitu :

1. Agen generasi pertama memiliki aktivitas yang sangat baik terhadap gram positif dan aktivitas rendah terhadap gram negatif. Keunggulannya dengan

penicillin adalah aktivitasnya terhadap bakteri penghasil penisilinase. Termasuk di dalam *cephalosporin* generasi pertama ialah : *Cephalothin*, *Cephapirin*, *Cefazolin*, *Cephalexin*, *Cephadrine*, dan *Cefadroxil*.

2. Agen generasi kedua memiliki aktivitas yang lebih baik terhadap gram negatif dan memiliki aktivitas anti anaerob. Termasuk di dalam *cephalosporin* generasi kedua ialah : *Cefaclor*, *Cefamandole*, *Cefuroxime*, *Cefonicid*, *Ceforanide*, *Cefaclor*, *Cefoxitin*, *Cefotetan*, *Cefprozil*, *Cefuroxime* asetil, *Cefmetazole*, dan *Loracarbef*.
3. Agen generasi ketiga memiliki aktivitas terhadap gram positif dan aktivitas yang lebih besar terhadap *Enterobacteriaceae*. Hal penting yang dimiliki oleh generasi ini kecuali pada *cefoperazone* adalah kemampuan untuk mencapai sistem saraf pusat dan cairan *spinal* sehingga dapat digunakan untuk mengatasi meningitis. Termasuk dalam *cephalosporin* generasi ketiga ialah : *Cefotaxime*, *Ceftizoxime*, *Ceftriaxone*, *Ceftazidime*, *Cefoperazone*, *Cefixime*, *Cefpodoxime proxetil*, *Ceftibuten*, dan *Cefdinir*.
4. Agen generasi keempat meliputi seluruh spektrum antimikroba dari agen generasi ketiga dan peningkatan stabilitas untuk hidrolisis oleh β -laktamase. Dapat digunakan untuk mengatasi infeksi. *Cefepime* merupakan satu-satunya antibiotika dalam generasi ini.

2.2.1 Mekanisme Kerja Antibiotik β -Laktam

Mekanisme kerja antibiotik pada sel bakteri dapat terjadi melalui beberapa cara, yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, menghambat fungsi membran plasma, menghambat sintesis asam nukleat, menghambat sintesis protein melalui

penghambatan pada tahap translasi dan transkripsi meterial genetik serta dengan cara menghambat metabolisme folat (Sudigdoadi, 2015).

Mekanisme kerja dari antibiotik golongan beta-laktam yaitu dengan mencegah ikatan silang peptidoglikan pada tahap akhir sintesis dinding sel, yaitu dengan cara menghambat protein pengikat penisilin (*penicillin binding protein*). Protein ini merupakan enzim dalam membran plasma sel bakteri yang secara normal terlibat dalam penambahan asam amino yang berikatan silang dengan peptidoglikan dinding sel bakteri, dan mengeblok aktivitas enzim transpeptidase yang membungkus ikatan silang polimer-polimer gula panjang yang membentuk dinding sel bakteri sehingga dinding sel menjadi rapuh dan mudah lisis (Pratiwi, 2008).

2.2.2 Resistensi Antibiotik β -Laktam

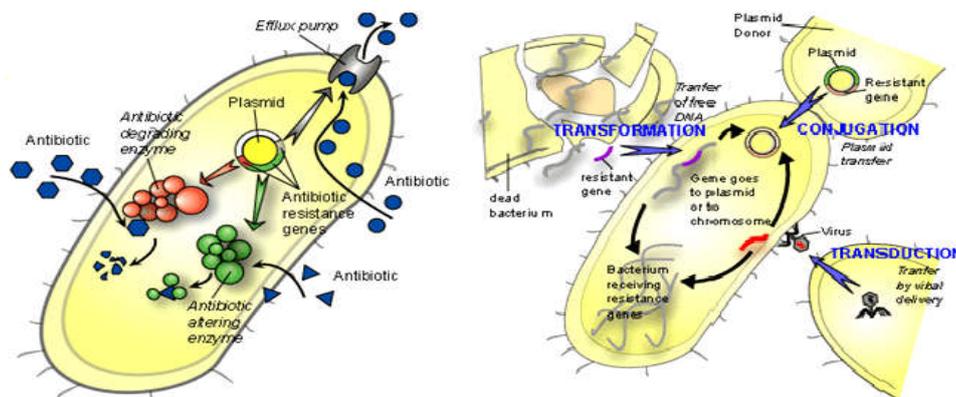
Resistensi antibiotik yaitu resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik yang digunakan untuk mengobati infeksi penyakit, atau resistensi patogen dari infeksi (bakteri, virus, protozoa) terhadap sediaan obat. Salah satu kelas antibiotik β -laktam merupakan komponen hidrofilik yang dapat menembus ke dalam sel bakteri melalui saluran porin dari membran terluar. β -laktam dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan struktur kimia dengan komponen umum berupa cincin β -laktam (Kang dkk, 2017).

Resistensi obat dapat disebabkan oleh mutasi dan seleksi, dengan pewarisan secara vertikal ke sel anak. Tetapi lebih sering ditemukan terjadi secara transfer horizontal dari sel donor, yaitu melalui transformasi, konjugasi atau transduksi. Transformasi terjadi saat bakteri mendapatkan DNA secara pasif dari bakteri sekitar yang telah mati. Konjugasi merupakan pengambilan secara aktif

fragmen dari DNA (plasmid) yang berisikan gen bakteri. Transduksi merupakan pengambilan DNA dengan bantuan bakteriofage yang memindahkan DNA nya ke dalam sel bakteri (Davies & Davies, 2010)

2.2.3 Mekanisme Resistensi Antibiotik β -Laktam

Mekanisme terjadinya resistensi oleh bakteri terhadap antibiotik beta-laktam dapat terjadi melalui empat cara: (1) perubahan *penicillin binding protein* (PBPs) pada setiap jalur yang menyebabkan lemahnya afinitas cincin beta-laktam terhadap PBPs, (2) memiliki dinding sel yang tidak mampu ditembus oleh molekul antibiotik untuk penetrasi ke dalam sel, (3) mengaktifkan mekanisme “*efflux pumps*” terhadap antibiotik oleh sel, dan (4) memproduksi enzim yang mampu menginaktivasi β -laktam (beta-laktamase) (Dierikx, 2013).



Gambar 2.3 Mekanisme resistensi antibiotik β -Laktam (Sumber Todar, 2011)

2.2.4 Resistensi Berbasis Permeabilitas

Membran luar bakteri Gram negatif memainkan peranan penting sebagai penghalang atau barrier terhadap berdifusinya senyawa hidrofilik dan interaksi dengan lingkungan luar bakteri. Pada bakteri Gram positif hal ini dapat dengan mudah mencapai membran sitoplasmik, sedangkan pada Gram negatif dilakukan oleh protein *channel* yang terdapat pada membran luar bakteri yaitu porins (Nikaido, 2003).

Porin dibagi dalam dua kelas yaitu spesifik dan non-spesifik. Pada *E.coli*, OMPc dan OMPf mewakili porin yang non spesifik dimana molekul polar kecil dapat berdifusi. Kehilangan salah satu porin akan berhubungan dengan resistensi antibiotik (Nikaido, 2003). Pada *Klebsiella* sp., OMPk36, OMPk35 dan OMPk34 homolog dengan OMPc, OMPa dan OMPf (Martinez-Martinez *et al.*, 2005). Perubahan membran luar pada pada *K.pneumoniae* tidak menentukan faktor dalam meningkatkan resistensi terhadap agen antimikroba, tetapi kehilangan porin dan ditambah dengan adanya produksi enzim beta-laktamase akan meningkatkan ketahanan terhadap antibiotik beta-laktam (Conejo *et al.*, 2000).

2.2.5 Pompa *efflux*

Mekanisme yang ketiga yang melibatkan resistensi terhadap antibiotik beta-laktam yaitu ekspresi dari pompa *efflux*. Pada protein transport, antibiotik dipompa dari dalam sel ke luar lingkungan sel. Karakteristik dari pompa ini terdiri dari bermacam-macam molekul transport, termasuk spesifisitas substratnya. Sistem *multidrug efflux* ini memainkan peranan penting dalam mekanisme resistensi pada bakteri Gram negatif (Poole, 2004 ; Nikaido, 2003).

Jenis-jenis antibiotik β -laktam yaitu antara lain :

1. *Cefotaxime*

Cefotaxime adalah antibiotik golongan *cephalosporin* generasi ketiga yang mempunyai khasiat bakterisidal dan bekerja dengan menghambat sintesis mukopeptida pada dinding sel bakteri. Pada pengobatan dengan *Cefotaxime*, bila pasien memiliki volume distribusi sangat kecil maka sebagian besar obat ada di dalam darah. Antibiotik *Cefotaxime* ini dapat diberikan secara i.v dan i.m karena absorpsi di saluran cerna kecil. Masa paruh eliminasi pendek sekitar 1 jam, maka

diberikan tiap 12 jam MIC dapat dicapai dalam waktu 10 jam. Ikatan protein plasma sebesar 40% (Purbaningrum dan Septiana, 2008).

2. *Ceftazidime*

Ceftazidime memiliki aktivitas terhadap bakteri yang tidak sebaik *cefotaxime* pada bakteri gram positif. Hal yang menonjol dari ceftazidim adalah aktivitasnya terhadap *P. aeruginosa* lebih besar dibandingkan dengan *cefotaxime*, *cefzulodine*, dan *piperacillin*. Waktu paruhnya di plasma adalah 1,5 jam. Obat ini tidak di metabolisme di dalam tubuh dan terutama diekskresi melalui saluran kemih. Dosis bagi orang dewasa adalah 1-2 gram sehari i.m atau i.v setiap 8-12 jam. Dosis obat perlu disesuaikan dengan kondisi gagal ginjal (Katzung, 2010).

2.3 *Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)*

2.3.1 Pengertian ESBL

ESBL adalah *enzim β -laktamase* yang secara umum terletak di dalam *plasmid* dan mampu menyebabkan resistensi bakteri terhadap *penicillin*, *cefalosporine* spectrum luas dengan rantai samping *oksimino* (*cefotaxime*, *ceftriaxon*, dan *ceftazidime*) dan *oksimino monobaktam* *aztreonam* (tetapi tidak terhadap *cefamisin* atau *carbapenem*) melalui hidrolisis ikatan amida dari antibiotik tersebut, tetapi dapat dihambat oleh inhibitor β -laktamase jenis serin yaitu *sulbaktam*, *klavulanat* dan *tazobaktam* (Kang dkk, 2017).

2.3.2 Klasifikasi ESBL

Anggota famili *Enterobacteriaceae* sering mengekspresikan *plasmid-encoded β -laktamase*, misalnya TEM-1, TEM-2, dan SHV-1 yang resisten terhadap *penicillin* namun tidak terhadap *cephalosporin*. Namun akhir-akhir ini

sudah banyak ditemukan bakteri penghasil β -laktamase yang resisten terhadap golongan antibiotik *cephalosporin*.

Jenis ESBL yang sering ditemukan adalah sebagai berikut :

1. SHV β -laktamases (Kelas A)
2. TEM β -laktamases (Kelas A)
3. CTX-M β -laktamases (Kelas A)
4. OXA β -laktamases (Kelas D)

2.3.3 Struktur dan Mekanisme Kerja β -Laktamase (ESBL)

Semua ESBL memiliki serine yang terletak *active sites* kecuali sebagian kecil *class B*, grup *Metallo β -laktamase*. Kelompok ini memiliki banyak kesamaan asam amino dengan *penicillin binding proteins* (PBPs). β -laktamase akan menyerang ikatan amida di cincin β -laktam *penicillin*, dan *cephalosporin* serta menghasilkan *penicillinoic acid* dan *cephalosporic acid* sehingga senyawa anti bakteri menjadi tidak aktif. Plasmid yang memiliki ukuran $\geq 80\text{Kb}$ dan bertanggung jawab terhadap pembawa gen ESBL. Pada organisme penghasil ESBL juga sering resisten terhadap antibiotik golongan *aminoglycoside*, *fluoroquinolon*, *tetracycline*, *chloramphenicol* dan *sulfamethoxazole*, *trimethoprin*.

Kehadiran organisme ESBL memproduksi dalam infeksi klinis dapat mengakibatkan kegagalan pengobatan jika salah satu kelas di atas obat yang digunakan ESBL bisa sulit untuk dideteksi karena mereka memiliki tingkat yang berbeda dari aktivitas terhadap berbagai *cephalosporin*. Jika ESBL terdeteksi, semua *penicillin*, *cephalosporin*, dan *aztreonam* harus dilaporkan sebagai resisten, bahkan jika dalam hasil tes invitro menunjukkan kerentanan.

Komite *national clinical laboratory standards* (NCCLS) telah mengembangkan kaldu mikrodilusi dan difusi cakram tes skrining menggunakan agen antimikroba yang dipilih. Sensitivitas skrining untuk ESBL pada organisme enterik dapat bervariasi tergantung pada agen antimikroba diuji. Penggunaan lebih dari satu lima agen antimikroba disarankan untuk skrining akan meningkatkan sensitivitas deteksi.

2.4 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara invitro dalam waktu relatif singkat dengan bantuan enzim DNA polimerase dan bahan-bahan lain.. Teknik ini pertama kali ditemukan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Prinsip dasar dari mesin PCR adalah pengontrolan suhu pada sampel, dengan rentang suhu 4-90°C (Wicaksono, 2015).

2.4.1 Peran dan Fungsi PCR

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan suatu reaksi enzimatik untuk melipat gandakan suatu urutan nukleotida tertentu secara invitro. Dengan menggunakan metode PCR, akan diperoleh pelipat gandaan suatu fragmen DNA sebesar 200.000 kali melalui 20 siklus reaksi selama 220 menit (Irianto, 2017). Empat komponen utama dalam proses PCR adalah :

1. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan.
2. Oligonukleotida primer, yaitu suatu urutan nukleotida pendek (15-25 basa nukleotida), digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA.

3. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yaitu terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP.
4. Enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis DNA PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing mempunyai tiga tahapan berulang yaitu denaturasi DNA pada suhu 94-100^oC, annealing (penempelan) pasangan primer pada DNA target pada suhu 37-60^oC, dan extension (pemanjangan) primer pada suhu 72^oC.

Fungsi dari PCR dapat digunakan untuk :

- a.) Amplifikasi urutan nukleotida,
- b) Menentukan kondisi urutan nukleotida suatu DNA yang mengalami mutasi,
- c.) Bidang kedokteran forensik,
- d) Melacak asal-usul seseorang dengan membandingkan "*finger print*".

Saat ini PCR sudah digunakan secara luas untuk berbagai macam kebutuhan, diantaranya :

- a) isolasi gen,
- b) DNA *sequencing*,
- c) forensik,
- d) diagnosis penyakit.

2.4.2 Komponen PCR

Polymerase chain reaction (PCR) adalah reaksi polymerase berantai, yaitu reaksi yang melibatkan enzim polymerase yang dilakukan secara berulang-ulang. Yang diulang-ulang adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polymerase (Irianto,

2017). Ada beberapa macam komponen utama dalam proses PCR, yaitu antara lain :

1. DNA Templat (cetakan)

Yaitu fragmen DNA yang dilipat gandakan. Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA di mulai dengan melakukan denaturasi DNA templat (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Persiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA *kromosom* atau DNA *plasmid*.

2. Oligonukleotida Primer

Yaitu suatu *sekuen oligonukleotida* pendek (15-25 basa *nukleotida*) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu *oligonukleotida* yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-*fosfat*, dan *oligonukleotida* yang kedua identik dengan *sekuen* pada ujung 3'OH rantai DNA cetakan yang lain. Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas *fragmen* DNA target yang akan di*amplifikasi* dan sekaligus menyediakan *gugus* (-OH) pada ujung 3' yang

diperlukan untuk proses *eksistensi* DNA. Dalam melakukan perancangan primer harus dipenuhi kriteria-kriteria yaitu sebagai berikut :

- a) panjang primer.
- b) komposisi primer.
- c) *melting temperature* (T_m).
- d) interaksi primer-primer.

3. Deoksiribonukleotida Trifosfat (dNTP)

Yaitu merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (*deoksiadenin trifosfat*), dTTP (*deoksitimin trifosfat*), dCTP (*deoksisitidin trifosfat*), dan dGTP (*deoksiguanosin trifosfat*). Dalam proses PCR dNTP bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada *gugus* -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat.

4. Buffer PCR dan $MgCl_2$

Yaitu berfungsi untuk menjamin pH medium. Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Selain *buffer* PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA *polymerase*. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP.

5. Enzim Polymerase DNA

Yaitu berfungsi katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim *polymerase* DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik

oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95°C . Aktifitas polymerase DNA tergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi.

2.4.3 Tahapan Reaksi PCR

Proses sintesis dan penggadaan DNA menggunakan PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu : denaturasi, *annealing*, dan extensi. Berikut ini adalah tiga tahap tersebut (Io et al., 2006; PCR Virtual Lab, 2012) :

1. Tahap denaturasi, merupakan tahap pemisahan sebuah untai ganda DNA agar terpisah menjadi dua buah untai tunggal DNA yang dilakukan pada suhu 94°C .
2. Tahap *annealing* (penempelan), merupakan tahap awal sintesis DNA secara *in vitro*. Suhu dan waktu yang diperlukan untuk proses *annealing* tergantung dsri komposisi dan panjang basa serta konsentrasi primer. Umumnya, untuk primer dengan panjang 18-30 pasang basa digunakan suhu 55°C selama 1-2 menit. Turunnya suhu menjadi 55°C mengakibatkan untai tunggal DNA cenderung akan bergabung dengan untai tunggal yang lain tetapi karena adanya primer, untai tunggal DNA tersebut dihambat untuk berpasangan kembali.
3. Tahap extensi (pemanjangan), biasanya dilakukan pada suhu 72°C . Tahap ini merupakan proses pemanjangan primer oleh DNA *polymerase*. Enzim ini menjadi aktif karena adanya perubahan suhu menjadi 72°C .

Proses PCR melibatkan beberapa tahap, yaitu :

1. Pra denaturasi DNA templat
2. Denaturasi DNA templat

Adalah proses penguraian materi DNA dari bentuk heliksnya yang dipisahkan dengan suhu 90-96°C.

3. Penempelan primer pada templat (*annealing*)

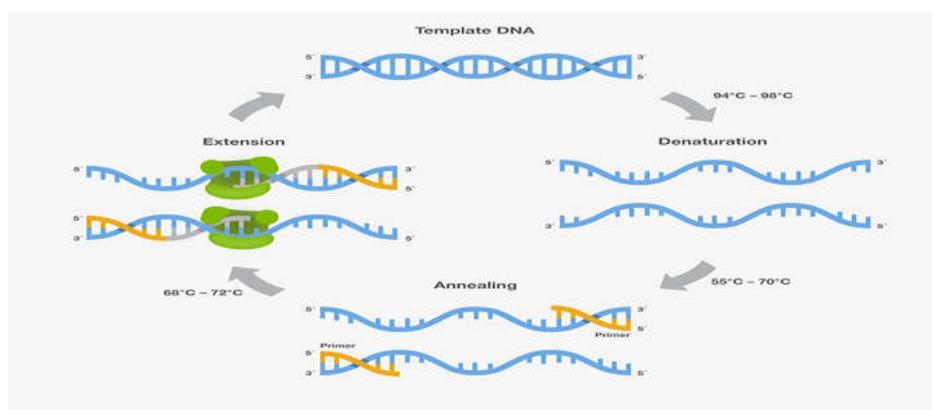
Adalah suatu proses penempelan primer ke DNA templat yang sekarang hanya satu untai.

4. Pemanjangan primer (*extention*)

Adalah suatu proses pemanjangan rantai DNA baru yang dimulai dari primer.

5. Pemantapan (*post extention*)

Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA.



Gambar 2. 4 PCR cycling parameters (Sumber thermofisher.com)

2.4.4 Optimasi PCR

Untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor seperti jenis *polymerase* DNA, suhu, konsentrasi, dalam hal ini berkaitan dengan dNTP, MgCl₂ dan DNA *polymerase*, buffer PCR dan waktu.

2.4.5 Prinsip Kerja Mesin PCR

Untuk melakukan otomatisasi pada teknik PCR, maka dibuat sebuah alat yang disebut mesin PCR. Mesin PCR sering disebut juga sebagai *thermocycler*. Pada prinsipnya mesin PCR melakukan pengontrolan suhu pada tiga tahap proses sintesis dan penggandaan DNA (*denaturation*, *annealing*, dan *extension*) (Wicaksono, 2015).

Saat ini ada beberapa mesin PCR, yakni (PCR Virtual Lab, 2012) :

- a) Mesin PCR konvensional. Digunakan untuk mendeteksi dan menggandakan DNA.
- b) *Real-time* PCR. Digunakan untuk mendeteksi, menggandakan dan menghitung jumlah salinan awal DNA.
- c) PCR *multiplex*. Digunakan untuk mendeteksi dan menggandakan dua atau lebih DNA yang berbeda secara simultan, tipe ini merupakan gabungan dari tipe PCR konvensional dan *real-time*.
- d) *Nested*-PCR. Digunakan untuk mendeteksi dan menggandakan DNA primer dengan eksternal dan internal.
- e) *Reverse Transcription* (RT)-PCR. Digunakan untuk mendeteksi dan menggandakan RNA (bukan DNA).

2.5 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Elektroforesis adalah migrasi ion-ion di bawah pengaruh medan listrik. Senyawa-senyawa yang bermuatan listrik akan bergerak ke arah elektroda yang mempunyai muatan yang berlawanan. DNA mempunyai muatan negatif dan mempunyai rasio muatan /

massa yang konstan, sehingga kecepatan migrasi DNA selama elektroforesis tergantung berat molekul DNA tersebut.

Elektroforesis merupakan proses bergerakaknya molekul yang bermuatan (dari kutub negatif menuju ke kutub positif) di dalam gel yang direndam larutan penyangga. Ada bermacam-macam zat kimia yang dapat digunakan sebagai gel di dalam elektroforesis. Penggunaan jenis gel ini disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai. Secara umum ada dua jenis gel yang biasa digunakan yaitu *Agarose Gel Electrophoresis* (AGE) dengan visualisasi menggunakan *Ethidium Bromide* dan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) dengan visualisasi menggunakan *silver staining*. Untuk pemisahan DNA berukuran kecil (<200 pasang basa) digunakan gel *polyakrilamida* sedangkan untuk pemisahan DNA berukuran besar digunakan gel agarosa. DNA dalam gel agarosa dapat terlihat dengan penambahan *red gel* yang akan berikatan dengan DNA dan akan bersifat *fluorescens* di bawah sinar UV. Penambahan *loading dye* dilakukan bertujuan sebagai penanda pergerakan DNA dalam gel agarose.

2.5.1 Prinsip Kerja

Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (*anion*), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode), elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi dari DNA. Prinsipnya alat elektroforesis. dibagi menjadi 2 yaitu *horizontal electrophoresis* dan *vertical electrophoresis*.

Elektroforesis. gel memiliki beberapa komponen yang terdiri dari :

- 1.) *Comb*, digunakan untuk membentuk well pada gel *agarose*,
- 2.) *Tray*, digunakan untk sebagai cetakan gel agarose,

3.) *Chamber*, digunakan sebagai wadah gel agarose,

4.) Sumber listrik : digunakan untuk member arus saat proses elektroforesis.

2.5.2 Manfaat Elektroforesis

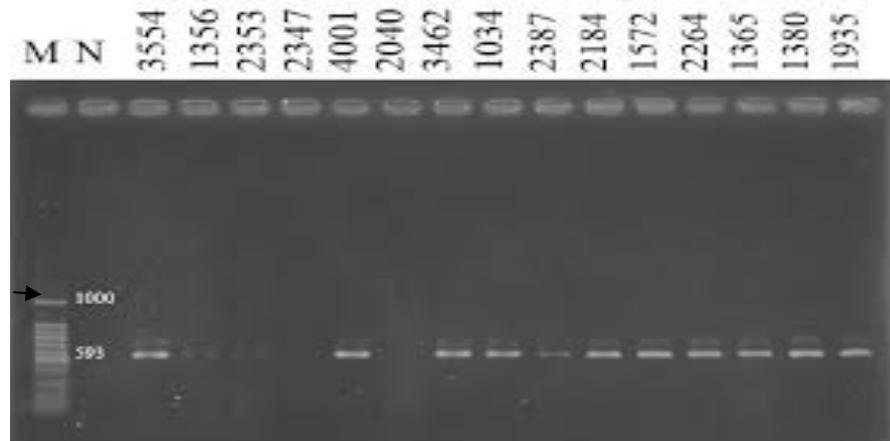
Elektroforesis dapat diaplikasikan untuk berbagai macam kegiatan, antara lain membandingkan gen homolog dari spesies yang berbeda, mengetahui susunan *sekuens* berbagai genom, *DNA finger printing*, mengetahui ada atau tidaknya gen-gen penyebab kelainan genetik atau penyakit tertentu, mendeteksi lokasi dan jumlah mRNA dalam sel atau jaringan tertentu, mengetahui aktivitas gen selama perkembangan berbagai tipe sel organisme atau aktivitas gen sebelum dan sesudah diberi perlakuan tertentu, mendeteksi lokasi dan jumlah mRNA dalam sel atau jaringan gen sebelum dan sesudah diberi perlakuan tertentu, mempelajari evolusi tingkat molekuler, mengetahui variasi genetik dalam populasi natural di alam, menentukan atau mengidentifikasi berat molekul fragmen DNA, RNA, protein dan aktifitas enzimatis, menganalisis fragmen DNA yang diamplifikasi melalui PCR, mengidentifikasi persamaan dan perbedaan genetik antar individu, dan menentukan jumlah fragmen DNA yang *diklon* dalam rekombinan plasmid DNA (Russel, 1994, Fairbanks and Andersen, 1999).

Manfaat elektroforesis gel antara lain untuk mengetahui ukuran fragmen DNA dari produk PCR, memisahkan produk DNA dari hasil digesti yang berbeda ukuran, lalu dapat disekuensing, dan juga untuk pemurnian atau purifikasi DNA.

2.5.3 Hasil Pembacaan Elektroforesis

Hasil pembacaan elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya band yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-

potongan jumlah pasangan basanya. Adapun contoh hasil dari pembacaan elektroforesis PCR (Gambar 2.5)



Gambar 2.5 Contoh hasil pembacaan elektroforesis PCR (Sumber :Yulianto, 2011)