

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Tiga puluh sampel urin pasien ISK berdasarkan hasil uji morfologi dan uji biokimia kuman yang teridentifikasi tergolong kelompok bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil ini menunjukkan kuman yang banyak teridentifikasi sebagai penyebab ISK adalah *Escherichia coli*. Penelitian oleh Yashir, M., & Apriani, A. (2019) memperoleh bakteri terbanyak penyebab ISK adalah *Escherichia coli* sebesar 31 %, *Klebsiella pneumoniae* 24 %, dan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 3 %.

Koloni yang tumbuh pada media MCA memiliki morfologi yang bermacam-macam. Koloni yang teridentifikasi sebagai *Escherichia coli* memiliki koloni yang berwarna merah muda ukuran kecil dengan permukaan yang cembung, kering, dan memiliki tepi yang rata. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu oleh Widianingsih, M., & de Jesus, A. M. (2018) yang mengisolasi kuman dari sampel urine ISK RS Bhayangkara Kediri memperoleh hasil *Escherichia coli* sebanyak 40 % dengan ciri koloni bulat kecil berwarna merah semi mucoid dengan tepi rata dan permukaan yang cembung, *Klebsiella pneumoniae* sebanyak 10 % dengan koloni bulat besar berwarna merah mucoid dengan tepi rata dan permukaan yang cembung, dan 50% menunjukkan hasil negatif. Milanda dkk (2014) menyebutkan bentuk koloni. *E. coli* akan membentuk koloni merah dengan permukaan yang kering.

Penelitian ini menggunakan media MCA dikarenakan pada media MCA mengandung garam empedu dan kristal violet yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri Gram positif (Waluyo,2010). Hal ini menyebabkan tidak semua bakteri dapat tumbuh dengan baik sehingga media ini dapat digunakan

secara khusus untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif. Komposisi lain MCA yaitu laktosa menjadi sumber karbohidrat bakteri batang Gram negatif sekaligus digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi laktosa.

Hasil uji biokimia pada penelitian ini memperoleh hasil uji biokimia *Escherichia coli* dapat memfermentasi glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa, ditandai dengan perubahan warna media menjadi warna kuning, memproduksi gas yang ditandai dengan terbentuknya gelembung udara dalam tabung durham atau tabung durham yang terangkat, mampu mendegradasi asam amino triptofan yang menghasilkan produk indol, bersifat motil, menghasilkan campuran asam sebagai produk fermentasi glukosa, tidak memproduksi H<sub>2</sub>S, tidak menghasilkan *acetoin*, urease positif dan tidak menggunakan *citrate* sebagai sumber karbon.

Uji saring (skrining) terhadap enzim ESBL<sub>s</sub> adalah uji awal untuk mengetahui adanya enzim *beta lactamase* yang diproduksi oleh bakteri. Uji ini dilakukan dengan metode difusi cakram (*Disc diffusion method*) menggunakan media MHA (Muller Hinton Agar) yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri dengan standard kekeruhan 0,5 *Mc Farland* ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Antibiotik yang digunakan pada uji ini adalah antibiotik golongan  $\beta$ -*lactam* spektrum yang diperluas (cefalosporin generasi ketiga) untuk mengetahui adanya resistensi dari bakteri terhadap antibiotik *cefotaxime* dan *ceftriaxone*. Kedua antibiotik tersebut termaksud dalam kelompok antibiotik cephalosporin generasi ketiga yang memiliki spektrum yang luas terhadap bakteri Gram negatif dan positif, tetapi lebih efektif ke Gram negatif terkhusus golongan *Enterobacteriaceae*. Antibiotik golongan

cephalosporin mempunyai cincin beta laktam yang bekerja dengan menargetkan PBP<sub>s</sub> pada bakteri sehingga PBP<sub>s</sub> tidak dapat menjalankan perannya untuk pembentukan peptidoglikan. Kelainan dalam struktur dinding sel ini mengakibatkan kematian sel bakteri.

Uji skrining ini untuk melihat penghambatan terhadap pertumbuhan bakterih *E. coli* yang di tandai dengan adanya zona hambat (terlihat sebagai daerah jernih) disekitaran disk anntibiotik Diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Selanjutnya dikatakan bahwa semakin lebar diameter zona hambatan yang terbentuk bakteri tersebut semakin sensitif (Dian & Budiarmo, 2015). Berdasarkan hasil Uji saring atau skrining ESBL bakteri 12 sampel *Escherichia coli* menghasilkan diameter zona hambat pada antibiotik *cefotaxime* berkisar 27-40 mm dan *ceftriaxone* berkisar 26-32 mm. Sedangkan 2 sampel yaitu S3 dan S24 tidak ditemukan zona hambat pada disk antibiotik *cefotaxime* dan *ceftriaxone*. Hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan standar CLSI 2014 dimana antibiotik *ceftriaxone* resisten jika terbentuk zona diameter  $\leq 25$  mm dan *cefotaxime*  $\leq 22$  mm. Dapat disimpulkan bahwa bakteri *Escherichia coli* dengan kode sampel S3 dan S24 resisten terhadap antibiotik *cefotaxime* dan *ceftriaxone*.

Penyebab terjadinya resistensi antibiotika pada pasien infeksi lebih banyak berkaitan dengan pemberian terapi yang tidak sesuai atau tidak seharusnya dan durasi pemberian antibiotika yang tidak benar. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kemenkes RI (2011) yang menemukan 40%-62% antibiotika

digunakan secara tidak tepat untuk penyakit yang sebenarnya tidak memerlukan antibiotika.

*Extended Spectrum Beta-laktamase* menghasilkan resistensi antibiotika dengan cara memecah struktur antibiotika. Cincin beta laktam yang merupakan bagian aktif dari antibiotik akan dibuka oleh *Beta-lactamase* dan merubah struktur dari antibiotik dan menghalangi ikatan penisilin binding protein (PBPs). Proses ini akan menyebabkan sintesis dinding sel *Escherichia coli* tidak dapat dihambat oleh antibiotik. Perubahan dari struktur antibiotik akan menyebabkan inaktivasi dari antibiotik tersebut. (Forbes *et al*, 2007). Gen pengkode ESBLs banyak berada di plasmid atau kromosom. Gen-gen tersebut mengalami mutasi dan berubah konfigurasi asam aminonya di bagian aktif dari *beta-lactamase*. Keberadaan gen pengkode di plasmid menyebabkan gen ESBLs mudah berpindah dari organisme satu ke yang lain. Perpindahan ini menyebabkan penyebaran resistensi antar strain dan spesies.

Sampel kode S3 dan S24 dilanjutkan dengan uji *Double Disk Sinergy Test* (DDST) sebagai uji konfirmasi ESBLs. Uji DDST merupakan uji yang digunakan untuk mendeteksi adanya ESBLs yang diproduksi oleh bakteri dengan menggunakan amoksisilin asam klavulanat sebagai beta lactam inhibitor. Metode ini digunakan untuk *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Klebsiella oxytoca* (*Clinical and Laboratory Standards Institute*.,2014). Adanya peningkatan zona inhibisi kearah antibiotik yang mengandung *β-lactama inhibitor* merupakan indikasi adanya suatu ESBLs. Hal ini dikarenakan *β-lactama inhibitor* berdifusi

kedalam media dan akan mendeteksi adanya enzim betalaktamase disekitar antibiotik *ceftriaxone* atau *cefataxime* yang ditandai dengan terbentuknya zona.

Uji DDST yang dilakukan pada sampel dengan kode S3 menunjukkan peningkatan zona hambatan kearah disc antibiotik amoksisilin klavulanat. Hal ini mengindikasikan adanya produksi ESBLs, sedangkan sampel dengan kode S24 memperoleh hasil negatif atau tidak terbentuk zona hambatan kearah disc antibiotik amoksisilin klavulanat. Menurut (Drieue *et al*, 2008) beberapa organisme dengan ESBLs dapat mengandung beta-lactamase yang lain sehingga menutupi produksi ESBLs pada *phenotypic test* sehingga hasil tes akan *false negative*.

Sampel kode S3 di uji PCR untuk mendeteksi gen SHV. Proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA. Denaturasi merupakan proses pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (templat) sebagai tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase, dengan pemanasan singkat pada suhu 90-95°C selama beberapa menit.

Primer yang digunakan adalah primer SHV (F) 5'-GGG-TTA-TTC-TTA-TTT-GTC-GC-3' dan SHV (R) 5'-TTA-GCG-TTG-CCA-GTG-CTC-3'. Primer sebaiknya menempel pada daerah yang spesifik. Semakin panjang primer, maka semakin harus spesifik daerah yang di amplifikasi (Yuzuf, 2010). Menurut Pertiwi (2015) Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada template hal ini ditandai dengan semakin tipisnya band yang terbentuk, sedangkan suhu *annealing* yang rendah menyebabkan primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan

menyebabkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan. Aris (2013) menyebutkan jika suatu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam genom kelompok tersebut.

Hasil PCR menunjukkan sampel S3 tersebut tidak terbentuk pita pada panjang basa 928 bp. Pita DNA yang terbentuk pada sampel S3 yaitu pada 167 bp. Hasil negatif pada sampel S3 dapat terjadi karena gen ESBL<sub>S</sub> dapat disandi oleh beberapa gen lainnya seperti TEM dan CTX-M. Menurut Yuwono (2013) Enzim  $\beta$  lactamase SHV sangat umum ditemukan pada *K. pneumoniae* dan merupakan 20% dari *plasmid-mediated ampicillin resistance* pada spesies ini. Hal ini sesuai dengan temuan pada riset ini dimana gen SHV dominan pada *K. Pneumoniae*. Pada beberapa galur *K. pneumoniae*, gen blaSHV atau gen yang bersangkutan dengannya (*related gene*) terintegrasi dalam kromosom. Penelitian Yuwono (2013) membuktikan distribusi frekuensi Gen SHV pada kuman *Klebsiella pneumonia* 20 (62,50%), *Escherichia coli* 7 (21,86%), *Enterobacter aerogenes* 2 (6,25%), *Proteus mirabilis* 1 (3,13%), *Enterobacter agglomerans* 1 (3,13), dan *Enterobacter hafnia* 1(3,13).