

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Klebsiella* sp.

Bakteri ini berasal dari family *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella* pertama kali diteliti dan diberi nama oleh bakteriologist Jerman yang bernama Edwin Klebs (1834-1913). Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri ini antara lain adalah *bronkopneumoniae* dan pneumonia. Hampir semua pneumonia disebabkan oleh bakteri ini. *Klebsiella pneumonia* terdapat dalam saluran nafas dan feses sekitar 5 % orang normal dan dapat menyebabkan pneumonia bacterial (Patrick, 2005; Elmer, 2006)).

1. Aspek Biologi

Klasifikasi secara ilmiah :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Order	: <i>Enterobacteriales</i>
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Species	: <i>K.pneumoniae</i>

Klebsiella pneumoniae merupakan suatu bakteri gram negatif yang tidak bergerak (non motil), tidak berselubung, melakukan fermentasi laktosa, fakultatif anaerob, ditemukan sebagai flora normal di mulut, kulit dan usus. Spesies *Klebsiella* menunjukkan pertumbuhan mukoid, simpai polisakarida yang besar, tidak ada pergerakan dan biasanya memberikan hasil positif untuk tes dekarboksilase lisin dan sitrat. Morfologi khas dari *Klebsiella* dapat dilihat dalam pertumbuhan padat in vitro tetapi morfologinya sangat bervariasi dalam bahan klinik (Podscun, 1998).

2. Tes identifikasi *Klebsiella sp.*

Prinsip identifikasi *Klebsiella sp.* dengan melihat gambaran mikroskop, isolasi primer pada media, melihat penampakan koloni pada medium dan melakukan tes-tes biokimiawi antara lain :

a. *Mac Conkey*

Medium *Mac Conkey* Agar termasuk salah satu media isolasi primer. *Mac Conkey* merupakan medium selektif differensial yang mengandung zat warna khusus dan karbohidrat untuk membedakan koloni yang memfermentasikan laktosa (bewarna merah muda) dengan yang tidak memfermentasikan laktosa (tidak bewarna), ukuran dan bentuk koloni bervariasi tergantung spesies.

Kelompok *lactosa fermenter* seperti *Klebsiella sp.* menghasilkan koloni berwarna merah muda pada media isolasi primer (Gunarson, 1998). Koloni *Klebsiella sp.* membentuk koloni yang mukoid. Medium *Mac Conkey* memungkinkan identifikasi presumtif secara cepat pada bakteri enterik (Gupte ,

1990). Gambaran pertumbuhan *Klebsiella sp.* pada media *Mac Conkey* ditunjukkan pada Gambar 1 sebagai berikut :



Gambar 1. Koloni *K. pneumonia* tampak berwarna merah muda mukoid pada medium *Mac Conkey* (laktosa positif) (Buxton, 2005).

b. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

TSIA merupakan media yang dapat mengidentifikasi bakteri sesuai dengan karakter spesifik yang ditunjukkan oleh bakteri. Media TSIA mengandung 0,1% glukosa, 1% sukrosa, 1% laktosa, ferosulfat (untuk mendeteksi produksi H_2S), ekstrak jaringan (substrat pertumbuhan protein), dan indikator pH (fenol merah). Zat tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi sehingga menghasilkan agar miring dengan bagian pangkal yang dalam dan diinokulasi dengan menusukkan pertumbuhan bakteri ke dalam bagian pangkal. Jika memfermentasikan glukosa bagian miring dan pangkal akan berubah warna kuning akibat sejumlah kecil asam yang dihasilkan. Apabila produk fermentasi kemudian dioksidasi menjadi CO_2 dan H_2O dan dilepaskan dari agar miring serta dekarboksilasi oksidatif protein masih berlanjut dengan pembentukan amino, bagian miring berubah menjadi alkalin (merah). Reaksi oleh *Klebsiella sp.* pada TSIA yaitu asam/asam

berwarna kuning pada bagian pangkal dan miring, dapat terdeteksi gas, tidak dihasilkan H₂S (Brooks *et al.*, 2008; Lehman, 2013).

c. Test motilitas pada agar semisolid

Uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan dari bakteri yang ditandai adanya kekeruhan seperti kabut pada media (Bibiana, 1994). Uji Bakteri diinokulasikan dengan menggunakan suatu kawat lurus melalui pusat medium. Organisme-organisme non-motil seperti *Klebsiella sp.* hanya tumbuh pada garis inokulum. Sedangkan organisme yang motil tumbuh keluar dari medium, dan tampak keruh (Brooks *et al.*, 2008; Hart, 1997).

d. Tes Indol

Uji indol untuk menilai pembentukan indol oleh bakteri dari triptopan sebagai sumber karbon. Bila positif menghasilkan warna merah sedangkan apabila negatif menghasilkan warna kuning. *Klebsiella sp.* merupakan bakteri dengan indol negatif (Hart, 1997). Pembentukan indol dalam media dapat diketahui dengan penambahan reagen *Kovacs* yang mengandung *dimetilaminobenzaldehid* dan akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media karena indol akan bereaksi dengan *dimetilaminobenzaldehid* sehingga membentuk *rosindol* yang berwarna merah (Bibiana, 1994).

e. Tes metil merah dan Voges – Prokauer (VP)

Tes metil merah digunakan untuk mendeteksi produksi asam selama proses fermentasi glukosa. Pembentukan asam pada fermentasi glukosa memberikan warna merah dengan indikator metil merah. Voges – Prokauer merupakan uji untuk menentukan organisme yang memproduksi dan mengelola asam dan fermentasi glukosa, memperlihatkan kemampuan sistem buffer dan menentukan

bakteri yang menghasilkan produk netral (*asetil metal karbinol* atau *aseton*) dari hasil fermentasi glukosa. *Klebsiella sp.* menghasilkan warna merah yang memberikan hasil positif terhadap reaksi VP (Hart, 1997).

f. Tes sitrat

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Enzim sitrat yang dihasilkan bakteri memecah sitrat yang berasal dari natrium sitrat dalam media menjadi piruvat yang selanjutnya akan direduksi pada proses fermentasi. Uji sitrat menggunakan indikator *bromthymol blue*. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri dan terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi biru yang disebabkan oleh peningkatan pH medium di atas 7,6 karena adanya ammonia yang dihasilkan yang berasal dari *monoammonium phosphate* yang terdapat pada medium. Biakan diinokulasi pada media simmon sitrat agar dengan inokulum yang tipis kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika hasil positif terjadi perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru yang bermakna pertumbuhan bakteri pada medium sitrat menghasilkan keadaan alkalis dan bakteri telah menggunakan sitrat. *Klebsiella sp.* memberikan reaksi positif terhadap penggunaan sitrat (Elmer, 2006).

g. Test urea

Uji hidrolisis urea menunjukan bakteri menghasilkan enzim urease. Beberapa mikroorganisme mampu menghasilkan enzim urease yang menguraikan mikromolekul urea ((NH₂)₂CO) menjadi karbondioksida (CO₂) dan ammonia (NH₃). Dilakukan dengan cara menggoreskan pembiakan 1 ose pada permukaan agar miring. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tes dinilai positif

apabila menghasilkan warna merah muda dan negatif apabila warna tidak berubah. Bakteri *Klebsiella sp.* menghasilkan nilai positif pada pemeriksaan ini (MacFaddin, 2000).

Karakteristik hasil test biokimia bakteri *Klebsiella sp.* dapat dilihat pada tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Karakteristik Reaksi Uji biokimia *Klebsiella sp.* (Soemarno, 2003)

No	Uji biokimia	<i>Klebsiella sp</i>
1	TSIA	
	Lereng/Dasar	Kuning/Kuning
	Gas	Positif/+
	Sulfur	Negatif/-
2	SC	Positif/+
3	Urea	Positif/+
4	SIM	
	Sulfur	Negatif/-
	Indol	Negatif/-
	Motility	Negatif/-

3. Penyakit yang Ditimbulkan (Patogenitas)

Penyakit utama yang ditimbulkan oleh bakteri ini adalah pneumonia.

K.pneumoniae dapat menyebabkan pneumonia bakterial. *K.pneumoniae* dapat menyebabkan konsolidasi luas disertai nekrosis hemoragik pada paru-paru.

Klebsiella kadang-kadang menyebabkan infeksi saluran kemih dan bakteremia dengan lesi pada pasien yang lemah. *Klebsiella* menduduki ranking kedua setelah *E.coli* untuk infeksi saluran kemih di orang-orang yang sudah berumur.

Klebsiella juga merupakan suatu *opportunistik* patogen untuk pasien dengan penyakit paru-paru kronis dan rhinoscleroma. Feses adalah salah satu sumber yang paling signifikan dalam hal infeksi kepada pasien, yang selanjutnya

diikuti oleh berhubungan dengan alat-alat yang sudah terkontaminasi oleh bakteri (Podschun, 1998; Sarathabu, 2012).

Pneumonia dapat terjadi akibat menghirup bakteri yang ada di udara. Selain itu dapat juga disebarkan melalui darah yang berasal dari tempat lain misalnya luka, dan perpindahan langsung bakteri dari infeksi di dekat paru-paru. Jika melalui saluran nafas, bibit penyakit yang masuk akan dilawan oleh berbagai macam sistem pertahanan yang dimiliki oleh tubuh kita. Yang dimaksud dengan sistem pertahanan tubuh, misalnya struktur kulit, proses batuk, hingga sel-sel pembunuh yang berada dalam darah maupun cairan limfe kita (sistem antibodi). Pada orang-orang yang terganggu pertahanan tubuhnya, misalnya kesadaran menurun, usia lanjut, menderita penyakit pernapasan kronik, infeksi virus, diabetes mellitus, dan penyakit kronis lainnya, termasuk juga pada penderita penyakit payah jantung atau kanker, mereka itu menjadi mudah sakit. Selain itu, jumlah bakteri atau virus serta keganasan virus/bakteri tersebut yang masuk ke tubuh calon penderita bisa mempengaruhi, apakah seseorang menjadi sakit atau tidak (Jawetz, 2007).

Gejala-gejala yang biasanya timbul dari penderita pneumonia antara lain batuk berdahak dimana dahaknya seperti lendir berwarna hijau atau seperti nanah, nyeri dada, menggigil, demam, mudah lelah, sesak nafas, sakit kepala, nafsu makan berkurang, mual, muntah, tidak enak badan, kekakuan sendi, kekakuan otot, kulit lembab, batuk darah, nyeri perut, dan pernafasan yang cepat. Untuk mendiagnosa diadakan berbagai macam pemeriksaan antara lain dengan menggunakan stetoskop, rontgen dada, pembiakan dahak dan

penghitungan gas darah arteri. Untuk pengobatan dapat digunakan senyawa yang memiliki cincin β laktam. Ada artikel yang menyebutkan bahwa kombinasi antara ampicilin dan kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan dari *Klebsiella* ini. Akan tetapi *Klebsiella* juga sudah resisten terhadap beberapa antibiotik, sehingga sampai sekarang para peneliti masih banyak mengadakan eksperimen untuk mencari obat yang ampuh untuk jenis bakteri ini (Peterson, 2005).

B. Infeksi Nosokomial

Infeksi adalah adanya suatu organisme pada jaringan atau cairan tubuh yang disertai suatu gejala klinis baik lokal maupun sistemik. Infeksi yang muncul selama seseorang tersebut dirawat di rumah sakit dan mulai menunjukkan suatu gejala selama seseorang itu dirawat disebut infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial berasal dari kata Yunani yang berarti rumah sakit, jadi infeksi nosokomial ialah yang diperoleh selama dalam perawatan di rumah sakit. Infeksi nosokomial biasanya timbul ketika pasien dirawat 3 x 24 jam di rumah sakit dan infeksi ini sangat sulit diatasi karena ditimbulkan oleh mikroorganisme (Darmadi, 2008).

1. Epidemi Infeksi Nosokomial

Epidemiologi adalah telaah mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya dan penyebaran penyakit pada sekelompok seseorang. Infeksi nosokomial banyak terjadi di seluruh dunia dengan kejadian terbanyak di negara termiskin dan negara yang sedang berkembang karena penyakit-penyakit infeksi masih menjadi masalah utama yang sulit diatasi.

Suatu penelitian yang dilakukan oleh WHO menunjukkan bahwa sekitar 8,7 % dari 55 rumah sakit dari 14 negara yang berasal dari Eropa, Timur Tengah, Asia Tenggara dan Pasifik masih menunjukkan adanya infeksi nosokomial dan yang terbanyak di Asia Tenggara dengan prosentase 10 % (Jeyamohan, 2010).

2. Sumber Infeksi Nosokomial

Sumber yang paling vital dan sebagai penyebab utama dari infeksi nosokomial adalah mikroorganisme. Berbagai macam mikroorganisme yang bisa menyebabkan infeksi ini yang biasanya terjadi di rumah sakit dan sebagian banyak terdapat dalam tubuh inang manusia yang sehat seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* dan beberapa *Actinomyces* sp. Mikroorganisme penyebab infeksi disebabkan oleh perubahan resistensi inang dan mikrobiota inang, bila ketahanan tubuh pasien rendah akibat luka berat, operasi, maka patogen dapat berkembang dan menyebabkan sakit (Tjietjen, 2004).

3. Faktor –Faktor Yang Mempengaruh Terjadinya Infeksi Nosokomial

Sejumlah faktor mempermudah kemungkinan terjadinya infeksi nosokomial pada penderita yakni bila penderita masuk rumah sakit, maka ketahanan dapat menurun hal ini disebabkan sistem imun (ketahanan tubuh) penderita/pasien sangat mudah dimasuki oleh mikroorganisme penyebab infeksi. Dalam proses penyebarannya biasanya melalui alat-alat kesehatan yang dipakai pada saat penanganan terhadap pasien seperti pembedahan, radiasi, injeksi dan cara penanganan atau pengobatan yang lain. Semua organisme termasuk bakteri, virus, jamur dan parasit dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi ini dapat disebabkan oleh mikroorganisme yang didapat dari orang lain

(*cross infection*) atau disebabkan oleh flora normal dari pasien itu sendiri (*endogen infection*). Kebanyakan infeksi yang terjadi dirumah sakit ini lebih disebabkan karena faktor eksternal, yaitu penyakit yang menyebar melalui makanan, udara, benda atau bahan yang tidak steril serta kebersihan lingkungan dan sanitasinya (Darmadi, 2008).

C. Antibiotik

Antibiotik disebut juga sebagai antimikroba merupakan zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba terutama fungi dan jamur, yang dapat membasmi jenis mikroba lainnya. Zat ini bisa diperoleh secara ilmiah, kecuali ada beberapa jenis yang disebut semi sintetis dan sintetis (Soemarno, 2003).

1. Penggolongan Antibiotik.

a. Berdasarkan aktivitas.

Berdasarkan aktivitasnya antibiotika dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu antibiotika kerja luas (*broad spectrum*), dapat menghambat pertumbuhan dan mematikan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif dan antibiotika kerja sempit (*narrow spectrum*), hanya aktif terhadap beberapa bakteri saja (Ganiswara, 1995; Lüllmann, *et al.*, 2005).

b. Berdasarkan gugus kimia.

Berdasarkan gugus kimianya, antibiotik dibagi menjadi 5 golongan yaitu

1. Senyawa Beta-laktam antara lain: golongan penisilin, sefalosporin dan sefamisin serta betalaktam lainnya.
2. Kloramfenikol, Tetrasiklin, Makrolida, Clindamisin dan Streptogramin.

3. Golongan Aminoglikosida, antara lain: streptomisin, neomisin, kanamisin, amikasin, gentamisin, tobramisin, sisomicin, etilmicin, dan lain-lain.
4. Sulfonamida, Trimethoprim, dan Quinolones. Antibiotika golongan Sulfonamida, antara lain Sulfasitin, sulfisoksazole, sulfamethizole, sulfadiazine, sulfamethoksazole, sulfapiridin, sulfadoxine dan golongan pirimidin adalah trimethoprim. Trimethoprim dan kombinasi trimetoprim-sulfametoksazol.
5. Fluoroquinolon adalah quinolones, golongan obat ini adalah asam nalidiksate, asam oksolinat, sinoksasin, siprofloksasin, levofloksasin, slinafloksasin, enoksasin, gatifloksasin, lomefloksasin, moxifloksasin, norfloksasin, ofloksasin, sparfloksasin dan trovafloksasin dan lain-lain (Katzung, 2007).

2. Mekanisme Kerja Antibiotik

Mekanisme kerja antibiotik dari antibiotik yaitu :

- a. Penghambatan pada sintesa dinding sel bakteri.

Bakteri mempunyai dinding sel yang merupakan lapisan luar dan kaku untuk mempertahankan bentuk sel dan mengatur tekanan osmotik di dalam sel.

Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung peptidoglikan, lipopolisakarida, lipoprotein, fosfolipid dan protein. Dinding sel mengandung polimer mukopeptida kompleks (murein dan peptidoglikan) terdiri dari polisakarida dan polipeptida. Polisakarida mengandung gula asam amino

N-asetilglukosamin dan asam asetat muramat. Asam asetat muramat ini hanya

dimiliki oleh sel bakteri. Pada gula asam amino menempel rantai peptida pendek dan ikatan silang dari rantai peptida ini, mempertahankan kekakuan dinding sel. Tempat kerja antibiotik pada dinding sel bakteri adalah lapisan peptidoglikan. Lapisan ini sangat penting dalam mempertahankan kehidupan bakteri dari lingkungan yang hipotonik, sehingga kerusakan atau hilangnya lapisan ini akan menyebabkan hilangnya kekakuan dinding sel dan akan mengakibatkan kematian (Neu dan Gootz, 2001).

Semua antibiotik golongan β -laktam bersifat inhibitor selektif terhadap sintesis dinding sel bakteri dengan demikian aktif pada bakteri yang dalam fase pertumbuhan. Tahap awal pada kerja antibiotik ini dimulai dari pengikatan obat pada reseptor sel bakteri yaitu pada protein pengikat penisilin (PBPs=*Penicillin-binding proteins*). Setelah obat melekat pada satu atau lebih reseptor maka reaksi transpeptidasi akan dihambat dan selanjutnya sintesis peptidoglikan akan dihambat. Tahap berikutnya adalah inaktivasi serta hilangnya inhibitor enzim-enzim autolitik pada dinding sel. Akibatnya adalah aktivasi enzim-enzim litik yang akan menyebabkan lisis bakteri. Resistensi terhadap penisilin disebabkan pembentukan enzim yang merusak penisilin yaitu enzim β -laktamase. Enzim ini akan menyebabkan terbukanya cincin β -laktam pada penisilin dan sefalosporin sehingga merusak aktivitas antimikroba (Chopra, 2002)

b. Penghambatan pada fungsi membran plasma.

Antibiotika bekerja dengan mengganggu fungsi pengaturan osmosis oleh membran sitoplasma (Brooks, 2004). Sitoplasma pada sel-sel hidup berikatan dengan membran sitoplasma yang berperan di dalam barrier permeabilitas

selektif, berfungsi di dalam transport aktif dan mengontrol komposisi internal dari sel. Bila fungsi integritas membran sel ini terganggu maka ion dan makromolekul akan keluar dari sel dan akan menghasilkan kerusakan dan kematian sel (Brooks, 2004).

c. Penghambatan melalui sintesis asam nukleat.

Antibiotik menghambat sintesa asam nukleat melalui tahapan : menghambat replikasi DNA, menghambat RNA polymerase, dan menghasilkan antimetabolit yang menghambat sintesis prekursor (Goering *et al.*, 2004).

d. Penghambatan pada sintesis protein.

Sintesis protein merupakan hasil akhir dari dua proses utama yaitu transkripsi dan translasi. Antibiotik yang mampu menghambat salah satu proses ini, akan menghambat sintesa protein (Goering *et al.*, 2004).

e. Penghambatan pada metabolisme folat.

Antibiotik mempengaruhi metabolisme folat melalui penghambatan kompetitif biosintesis tetrahidrofolat yang bekerja sebagai pembawa satu fragmen karbon yang diperlukan untuk sintesis DNA, RNA dan protein dinding sel (Goering *et al.*, 2004).

3. Test Resistensi Antibiotik

Pengukuran efek anti mikroba dapat dilakukan dengan test sensitivitas bakteri dengan dua tehnik yaitu dilusi dan difusi. Uji aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui batas kepekaan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri tertentu. Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode :

a. Metode Difusi

Metode disc diffusion (test Kirby & Bauer) untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008). Metode ini merupakan metode yang paling sering digunakan. Dalam difusi agar ada tiga metode, yaitu metode silinder, metode perforasi dan metode cakram kertas (Jawetz, 2007).

b. Metode Dilusi

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Tahap akhir metode ini, dilarutkan antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan (Jawetz, 2005). Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Pratiwi, 2008).

Tabel 2. Kriteria Pola Kepekaan Antibiotik Menurut CLSI 2012

No	Jenis Antibiotik	Disk Antibiotik	Kriteria Diameter zona Inhibisi (mm)		
			S	I	R
1	β Laktam	Ampicilin	≥ 13	14-16	≤ 17
2	β Laktam kombinasi	Amoksisilin-klavulanat	≥ 20	14-17	≤ 13
3	Flouoroquinolon	Siprofloksasin	≥ 21	16-20	≤ 15
4	Phenicol	Klorampenikol	≥ 16	11-15	≤ 10
5	Aminoglikosida	Gentamisin	≥ 15	13-14	≤ 12
6	Sepalosporins	Sefotaksim	≥ 26	23-25	≤ 22
		Seftriakson	≥ 21	14-20	≤ 13
		Septazidim	≥ 18	15-17	≤ 14

Ket : S : Sensitif; I : Intermedet ; R :resistan

D. Mekanisme Resistensi Antimikroba

Penggunaan bermacam-macam antibiotika yang tersedia telah mengakibatkan munculnya banyak jenis bakteri yang resisten terhadap lebih dari satu jenis antibiotika (*multiple drug resistance*). Resistensi bakteri adalah suatu keadaan dimana kehidupan bakteri itu sama sekali tidak terganggu oleh kehadiran antibiotika. Sifat ini merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh dari suatu makhluk hidup. Penggunaan antibiotika secara berlebihan dan tidak selektif akan meningkatkan kemampuan bakteri untuk bertahan (Stitzel and Craig, 2005).

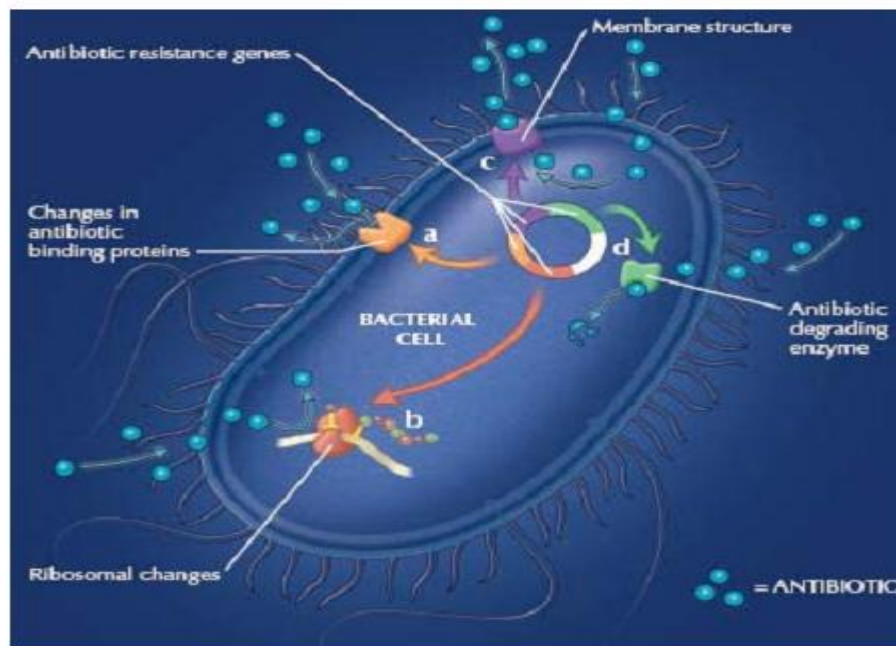
Mekanisme terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotika tergantung pada jenis bakteri, yaitu resistensi antibiotika oleh bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Menurut Peleg and Hooper (2010) terdapat beberapa mekanisme

resistensi antibiotika dari bakteri gram negatif yang digunakan sebagai perlawanan terhadap antibiotika. Mekanisme-mekanisme tersebut adalah: resistensi melalui penutupan celah atau pori (*loss of porins*) pada dinding sel bakteri, sehingga menurunkan jumlah obat yang melintasi membran sel; peningkatan produksi betalaktamase dalam periplasmik, sehingga merusak struktur betalaktam; peningkatan aktivitas pompa keluaran (*efflux pump*) pada transmembran, sehingga bakteri akan membawa obat keluar sebelum memberikan efek; modifikasi enzim-enzim, sehingga antibiotika tidak dapat berinteraksi dengan tempat target; mutasi tempat target, sehingga menghambat bergabungnya antibiotika dengan tempat aksi; modifikasi atau mutasi ribosomal, sehingga mencegah bergabungnya antibiotika yang menghambat sintesis protein bakteri; mekanisme langsung terhadap metabolik (*metabolic bypass mechanism*), yang merupakan enzim alternatif untuk melintasi efek penghambatan antibiotika dan mutasi dalam lipopolisakarida, yang biasanya terjadi pada antibiotika polimiksin, sehingga tidak dapat berikatan dengan targetnya.

Sifat yang dimiliki bakteri untuk resistensi terhadap golongan antibiotik ditentukan oleh elemen yang bersifat genetik maupun yang berada di dalam kromosom maupun diluar kromosom. Elemen genetika yang terpisah dari DNA kromosomnya disebut plasmid, yang merupakan gen pembawa sifat resistensi yang dapat dipindahkan melewati komponen yakni faktor R. Faktor R plasmid terdiri dari 2 unit yaitu segmen RTF (*resistensi transfer factor*) dan determinan-r (unit r). Segmen RTF berperan dalam perpindahan faktor R dan unit –r berperan untuk membawa sifat resistensi terhadap antibiotik tersebut (Royston, 1972).

Mekanisme genetik lain adalah transposon dan integron, yang memungkinkan gen pembawa plasmid menyatu (*integrated*) ke dalam kromosom bakteri sehingga resistensi yang terjadi menetap dan diturunkan ke generasi bakteri berikutnya (Shears, 2001). Sejumlah penelitian telah menguraikan tentang meningkatnya prevalensi resistensi pada kuman-kuman seperti *Klebsiella*. Indonesia, data mengenai prevalensi resistensi antimikroba sedikit sekali ditemukan. Kurangnya fasilitas laboratorium merupakan kendala besar di dalam pengembangan surveilans yang efektif. Untuk mempertahankan jangka efektivitas suatu antimikroba, khususnya di negara berkembang, perlu dilakukan perbaikan sistem surveilans untuk memantau timbulnya resistensi antimikroba, perbaikan akses laboratorium, peraturan penggunaan antimikroba yang lebih baik, dan pendidikan masyarakat.

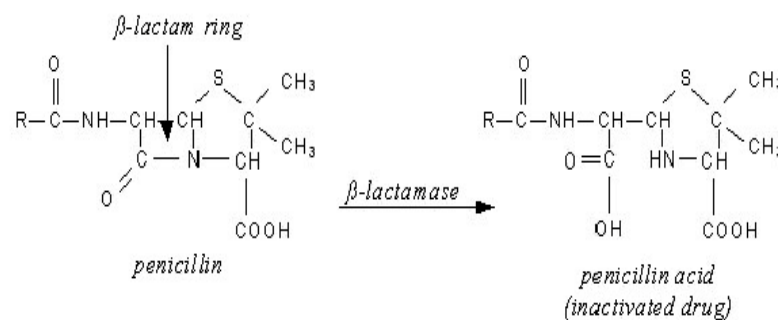
Mekanisme utama dari populasi mikroba untuk bertahan hidup dalam situasi terancam adalah dengan cara mutasi genetik, ekspresi dari suatu gen resistensi yang laten, atau melalui gen yang memiliki determinan resistensi. Ketiga mekanisme ini dapat berada bersama-sama dalam suatu bakterium. Penggunaan antibiotika secara berlebihan dapat menimbulkan tekanan selektif yang mendorong perkembang-biakan mikroorganisme yang resisten (Conly, 2002).



Gambar 2. Resistensi antibiotika oleh mutasi genetik akibat perubahan pada a. Kode ikatan protein, b. ribosom; c. struktur membran, d. inaktivasi enzim (Conly, 2002).

Faktor yang menentukan sifat resistensi mikroba terhadap antimikroba terdapat pada elemen yang bersifat genetik. Beberapa bakteri secara intrinsik resisten terhadap antimikroba tertentu. Contohnya bakteri gram positif, kuman ini tidak memiliki membran sel bagian luar (*outer membrane*), sehingga secara intrinsik resisten terhadap polimiksin yang bekerja merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Kebanyakan resistensi antibiotika terjadi akibat mutasi atau transfer horizontal gen yang membawa sifat resisten. Mutasi terjadi secara acak, spontan dan tidak tergantung dari adanya antimikroba. Mutasi terjadi bila terdapat kekeliruan dalam proses replikasi DNA yang luput untuk diperbaiki oleh sistem DNA repair. Mutasi terjadi dalam kecepatan bervariasi dan meliputi proses delisi, substitusi atau adisi satu atau lebih pasangan basa nukleotida, sehingga menghasilkan substitusi asam amino. Proses

mutasi yang dikenal sebagai *single step mutations* menyebabkan timbulnya resistensi tingkat tinggi dalam jangka waktu singkat dan cepat. Contohnya, mutasi di dalam sistem yang mengatur kromosom yang mengkode (*coded*) produksi β -laktamase oleh *Enterobacter* dan *Citrobacter sp.* (Nordmann, 2009). Hal ini mengakibatkan terjadinya produksi β -laktamase dalam jumlah yang sangat besar dalam waktu yang sangat singkat sehingga dapat menghidrolisis antimikroba bahkan yang stabil terhadap β -laktamase seperti seftazidim dan sefotaksim (Gambar 3).



Gambar 3. Resistensi antibiotika β -lactam oleh β -laktamase (Kariuki, 2001)

Sebaliknya, pada multistep mutation terjadi peningkatan resistensi secara bertahap. Kebanyakan informasi genetik bakteri dikode oleh kromosom, tapi tidak semuanya. Beberapa kuman memiliki gen ekstrakromosom baik berupa plasmid (untaian DNA ganda berpilin berukuran 2-200 kilobase tiap pasang) atau bakteriofag (virus bakteri yang dapat berintegrasi ke dalam kromosom bakteri). Elemen genetik ekstrakromosom ini dapat ditransmisikan secara vertikal (dari bakteri ke keturunannya melalui pembelahan biner) dan yang lebih penting lagi transmisi secara horizontal yang dapat melintasi spesies dan genus. Faktor

resistensi yang dipindahkan dapat berlangsung dari kromosom ke plasmid atau vice versa pada transposon dan integron (Kariuki S, 2001).

Ketika antibiotika diberikan, efek yang diharapkan adalah agar antibiotika itu mampu membunuh bakteri patogen yang merugikan dan pasien dapat disembuhkan. Tapi yang jarang menjadi pertimbangan adalah bahwa banyak antibiotika diabsorpsi secara tidak sempurna atau akan diekskresi kembali dalam bentuk utuh atau bentuk yang telah mengalami modifikasi tapi masih mempunyai aktivitas antimikroba. Dengan demikian setiap kali antibiotika digunakan, flora normal akan terpapar dalam konsentrasi dan lama pemberian obat yang bervariasi. Pemakaian antibiotika, khususnya bila digunakan tanpa aturan yang jelas seperti yang banyak terjadi di negara berkembang akan menyebabkan penggunaan antibiotika secara tidak rasional. Adanya penggunaan antibiotika secara berlebihan menyebabkan tingginya prevalensi resistensi pada flora normal. Meskipun resistensi ini bervariasi dari satu daerah dan daerah lainnya serta berbeda dari tahun ke tahun, namun jelaslah bahwa kemungkinan akan bertambah luasnya galur multiresisten ini telah menimbulkan banyak kekhawatiran.

E. Plasmid

Setiap organisme memiliki DNA yang terletak dalam inti sel atau nukleus yang disebut sebagai DNA kromosomal, begitu juga bakteri. Selain DNA kromosomal, bakteri memiliki juga DNA ekstrakromosomal yang disebut plasmid. Di dalam satu sel dapat ditemukan lebih dari satu plasmid dengan ukuran yang sangat

bervariasi. Umumnya plasmid menyandikan gen-gen yang diperlukan agar bertahan hidup pada keadaan kurang menguntungkan (Royston, 1972)

1. Macam-Macam Plasmid dan Peranannya

Yang paling berguna klasifikasi dari alami plasmid didasarkan pada karakteristik utama dikodekan oleh gen plasmid. lima jenis utama dari plasmid adalah sebagai berikut:

- a. Kesuburan atau F plasmid.
- b. *Resistance* atau R plasmid.
- c. *Cool* plasmid kode untuk colicins, protein yang membunuh bakteri lainnya.
Contohnya adalah ColE1 *E. coli*.
- d. Plasmid degradatif memungkinkan bakteri inang untuk memetabolisme molekul yang tidak biasa seperti toluena dan asam salisilat, contoh yang TOL *Pseudomonas putida*.
- e. Plasmid l Virulensi memberi patogenisitas pada bakteri tuan rumah; ini termasuk Ti plasmid dari *Agrobacterium tumefaciens*, yang menyebabkan penyakit empedu mahkota di tanaman dikotil. (Sujadi, 2008).

2. Isolasi Plasmid

Proses isolasi plasmid ada tiga tahapan yaitu pelisisan dinding sel bakteri, denaturasi DNA kromosom, dan pemisahan DNA pasmid dari debris serta pengotor. Salah satu metode isolasi DNA plasmid adalah *alkaline lysis* yang umum digunakan dalam teknologi rekayasa genetika. Prinsip isolasi DNA plasmid metode ini berdasarkan pada perbedaan struktural antara DNA plasmid yang berukuran kecil dibandingkan DNA kromosom (Sambrook, 2001).

Larutan yang digunakan dalam metode ini terdiri dari *alkaline lysis solution* I,II, III dan larutan *fenol kloroformisoamyl alkohol* (PCI). *Alkaline lysis* I terdiri atas *glukosa* dan *tris –cl* yang berfungsi menjaga tekanan osmotik pada pH 8,0 serta EDTA yang berikatan dengan kation *divalen* pada *lipid bilayer* sehingga dapat memecah dinding sel (Dellis, 2009).

Alkaline lysis solution II berfungsi sebagai pendenaturasi. Kandungan *Sodium dodesil sulfat* (SDS) berperan melarutkan lipid yang berasal dari membran sel dan protein sel sedangkan *Natrium Dihidroksida* (NaOH) membuat pH menjadi basa sehingga mendenaturasi DNA kromosom. (Dellis, 2009). Campuran ini tidak boleh divortek karena dapat mendenaturasi DNA plasmid (Sambrook, 2001).

Kandungan asam *asetat glasial* dan *potasium asetat* pada *alkaline lysis solution* III berperan sebagai penetral, pH kembali normal sehingga dapat merenaturasi rantai plasmid DNA. *Potasium asetat* mengendapkan SDS, *lipid* dan protein (Dellis, 2009).

Fungsi dari larutan PCI memisahkan DNA plasmid dari pengotor-pengotor seperti protein. *Fenol* melarutkan protein sedangkan *kloroform* memisahkan *fenol* dari fase *aqueous* sehingga larutan menjadi 2 lapisan lapisan bawah mengandung protein pengotor dan lapisan atas mengandung DNA plasmid (Sambrook, 2009). *Isopropanol* yang digunakan pada tahap isolasi plasmid bertujuan untuk presipitasi DNA (Ehrt and Schnappininger, 2003).

F. Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis merupakan suatu teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan ukurannya dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium penyangga matriks stabil. Teknik tersebut digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik negatif yang ada pada DNA. Gugus fosfat menyusun DNA menyebabkan DNA bermuatan negatif (Dellis, 2009)

Medium yang umum digunakan dalam teknik elektroforesis yaitu gel agarose. Agarose adalah polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut (Alison, 2007). Agarose membentuk gel karena adanya ikatan hidrogen ketika berada dalam larutan dingin. Ukuran pori tergantung pada konsentrasi agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya dalam suatu dapar, dapar yang digunakan harus sama dengan dapar yang digunakan pada tanki aparatus elektroforesis. Dapar yang umum digunakan adalah tris asetat-EDTA (TBE) (Yuwono, 2005).

Ketika molekul DNA digerakan melalui gel dengan adanya gaya elektrik yang stabil, kecepatan pergerakan molekul ini sepenuhnya bergantung pada ukuran molekul. Gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 50-20.000 pasang basa (pb) dan prosesnya dijalankan secara horizontal (Sambrook, 2009).

Laju migrasi molekul DNA pada gel agarosa menurut Sambrook dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

- a. Ukuran molekul DNA, dimana molekul DNA yang lebih besar akan bergerak lebih lambat dibanding molekul DNA yang lebih kecil. Hal ini disebabkan karena gaya friksi yang lebih tinggi pada molekul DNA yang besar.

- b. Konsentrasi agarosa, dimana terdapat hubungan linear antara log dari mobilitas elektroforesis DNA dengan konsentrasi gel.
- c. Konformasi DNA, dimana terdapat perbedaan migrasi kecepatan migrasi antar bentuk DNA sirkular superhelik, sirkular nick, dan liner. Pada beberapa kondisi, bentuk DNA sirkular superhelik bermigrasi lebih cepat dibandingkan bentuk linear, tetapi pada kondisi lain, keadaan ini bisa berbalik.
- d. Adanya Etidium Bromida, dimana peningkatan etidium bromida akan menyebabkan penurunan muatan negatif dari DNA untai ganda dan meningkatkan kekakuan serta panjang DNA tersebut.
- e. Tegangan yang digunakan, dimana pada tegangan yang rendah migrasi fragmen DNA yang linear proposional terhadap tegangan yang digunakan. Namun ketika kekuatan medan elektrik dinaikkan, mobilitas fragmen yang mempunyai bobot molekul tinggi akan meningkat. Oleh karena itu, efektivitas pemisahan gel agarosa menurun ketika tegangan dinaikkan.
- f. Tipe agarosa, dimana terdapat dua kelas utama agarosa yaitu agarosa standar dan agarosa bertitik leleh rendah.
- g. Buffer elektroforesis, dimana mobilitas DNA dipengaruhi oleh komposisi dan kekuatan ion pada buffer elektroforesis.