

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa tersebar luas di alam dan biasanya ada di lingkungan lembab di rumah sakit. *Pseudomonas aeruginosa* dapat berada pada orang sehat, dimana bersifat saprofit. Ini menyebabkan penyakit pada manusia dengan ketahanan tubuh yang tidak normal (Brooks *et al.*, 2005).

1. Klasifikasi, Morfologi dan Sifat Pertumbuhan

Klasifikasi secara ilmiah :

Kingdom : Bacteria
Fillum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Pseudomonadales
Famili : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan batang Gram negatif berukuran 0,6 x 2 μ m dan terlihat sebagai bentuk tunggal, ganda dan kadang-kadang dalam rantai pendek serta bergerak dengan flagel.



Gambar 1. *Pseudomonas aeruginosa* dengan pewarnaan Gram (Todar, 2008)

Pseudomonas aeruginosa bersifat aerobik obligat yang tumbuh dengan cepat pada berbagai tipe media, kadang memproduksi bau manis, seperti anggur atau seperti jagung (*corn taco like odor*). Beberapa galur menghemolisis darah.

Pseudomonas aeruginosa membentuk koloni bulat, halus dengan warna fluoresen kehijauan. Juga sering memproduksi pigmen kebiruan dan fluoresen yang disebut piosianin (*pyocyanin*) yang larut dalam agar. Spesies pseudomonas lain tidak memproduksi piosianin. Beberapa galur *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen fluoresen pioverdin yang memberi warna kehijauan pada agar. Beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap piorubin atau pigmen hitam piomelanin (Brooks *et al.*, 2005; Todar, 2008).

Pseudomonas aeruginosa pada biakan dapat memproduksi berbagai kelompok koloni, memberikan kesan biakan campuran beberapa spesies bakteri.

Pseudomonas aeruginosa dari bentuk koloni berbeda mungkin juga mempunyai aktifitas biokimia dan enzimatik yang berbeda, dan memberi profil kepekaan

yang berbeda terhadap antimikroba. Biakan dari pasien dengan kistik fibrosis menghasilkan *P. aeruginosa* yang membentuk koloni mukoid sebagai hasil dari kelebihan produksi alginat, sebuah eksopolisakarida (Brooks *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa tumbuh baik pada 37-42°C, pertumbuhan pada 42°C membantu membedakannya dari spesies pseudomonas pada kelompok fluoresen; bersifat oksidase positif. Tidak meragikan karbohidrat, tetapi berbagai galur mengoksidasi glukosa. Identifikasi biasanya berdasar pada bentuk koloni, adanya pigmen yang khas. Pembedaan pada *P. aeruginosa* dari *Pseudomonas* lainnya berdasar aktifitas biokimia membutuhkan tes dengan substrat yang banyak (Brooks *et al.*, 2005).

2. Struktur Antigen dan Toksin

Pili (*fimbriae*) menonjol dari permukaan sel dan berfungsi untuk perlekatan pada sel epitel inang. Kapsul polisakarida menyebabkan bentuk mukoid dari koloni yang dipisahkan dari pasien dengan kista fibrosis. Liposakarida yang ada dalam beragam bentuk antigenik, bertanggung jawab pada sifat endotoksin organisme. *Pseudomonas aeruginosa* dapat dibedakan secara serologis dengan anti-sera polisakarida dan dengan kepekaan terhadap piosin. Sebagian besar *Pseudomonas aeruginosa* yang dipisahkan dari infeksi klinis memproduksi enzim ekstraselular, termasuk elastase, protease, dan dua hemolisin: sebuah fosfolipase C yang tidak tahan panas dan glikolipid yang tahan panas (Brooks *et al.*, 2005).

Banyak galur *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi eksotoksin A yang menyebabkan jaringan nekrosis dan jika bentuk murni disuntikkan pada binatang bisa mematikan. Toksin memblok sintesis protein dengan sebuah mekanisme

yang identik dengan toksin diftteri, meskipun struktur kedua toksin tidak identik. Antitoksin terhadap eksotoksin A ditemukan di beberapa serum manusia, termasuk pada pasien yang sembuh dari infeksi *Pseudomonas aeruginosa* (Brooks *et al.*, 2005).

3. Patogenitas

Pseudomonas aeruginosa menjadi patogenik hanya jika berada pada tempat dengan daya tahan tidak normal, misalnya di selaput lendir dan kulit yang rusak akibat kerusakan jaringan. Bakteri menempel dan menyerang selaput lendir atau kulit, menyebar dari tempat tersebut, dan berakibat penyakit sistemik. Proses ini dipercepat oleh pili, enzim, dan toksin yang dijelaskan diatas. Lipopolisakarida mempunyai peran langsung dalam menyebabkan demam, syok, oliguria, lekositosis dan lekopenia, gangguan koagulasi darah (*Disseminated Intravascular Coagulation*, DIC), dan gejala susah bernafas pada orang dewasa. *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas* lain tahan terhadap berbagai antimikroba dan karena itu menjadi dominan dan penting jika bakteri yang lebih peka dari flora normal ditekan (Brooks *et al.*, 2005).

4. Temuan Klinis

Pseudomonas aeruginosa menyebabkan infeksi pada luka dan luka bakar, menghasilkan nanah warna hijau biru; meningitis jika masuk melalui fungsi lumbal; dan infeksi saluran kencing jika masuk melalui kateter dan instrumen atau karena larutan irigasi. Penyerangan pada saluran nafas, khususnya respirator yang tercemar, mengakibatkan pneumonia nekrotika (*necrotizing pneumonia*).

Bakteri sering ditemukan pada otitis eksterna ringan pada perenang. Hal ini dapat menyebabkan otitis eksterna ganas pada pasien diabetes. Infeksi pada mata, yang mengarah pada perusakan mata dengan cepat, biasanya terjadi sesudah luka atau operasi mata. Pada bayi dan orang yang lemah *Pseudomonas aeruginosa* mungkin masuk aliran darah dan mengakibatkan sepsis yang fatal, hal ini terjadi biasanya pada pasien dengan leukemia atau limfoma yang mendapatkan terapi antineoplastik atau terapi radiasi dan pada pasien dengan luka bakar yang berat.

Sebagian besar infeksi *Pseudomonas aeruginosa*, gejala dan tandanya tidak spesifik dan berkaitan dengan organ yang terserang. Kadang-kadang, verdoglobulin (hasil perpecahan hemoglobin) atau pigmen fluoresen dapat dideteksi pada luka, luka bakar, atau urine dengan sinar ultraviolet. Nekrosis hemoragik pada kulit sering terjadi dalam sepsis karena *Pseudomonas aeruginosa*, luka yang disebut ektima gangrenosum, dikelilingi daerah kemerahan dan sering tidak berisikan nanah. *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada sediaan hapusan dari lesi ektima yang diwarnai dengan Gram, dan hasil biakan positif. Ektima gangrenosum tidak biasa terjadi pada bakteremia oleh mikroba selain *P. aeruginosa*. (Brooks *et al.*, 2005).

5. Uji Laboratorium Diagnostik

Sampel untuk pemeriksaan *Pseudomonas aeruginosa* berasal dari luka kulit, nanah, darah, cairan spinal, sputum, dan bagian lain diambil sesuai tempat infeksi. Pemiakan merupakan tes spesifik dari diagnosis infeksi *Pseudomonas aeruginosa* (Brooks *et al.*, 2005).

Media Perbenihan dan uji biokimia untuk *Pseudomonas aeruginosa* terdiri dari :

a. *Mac Conkey*

Mac Conkey agar adalah medium kultur yang dirancang untuk menumbuhkan bakteri Gram-negatif dan membedakan mereka berdasarkan kemampuan memfermentasi laktosa. Media ini berisi garam empedu dan kristal violet untuk menghambat sebagian besar bakteri Gram-positif, indikator neutral red sebagai indikator pH untuk mengetahui adanya fermentasi laktosa.

Pada dasarnya bakteri enterik dipisahkan ke dalam dua kelompok yaitu :

Basil yang menghasilkan asam dari fermentasi laktosa, hal ini menjadikan medium di sekitar pertumbuhan juga akan berubah menjadi merah. Selain itu pengaruh asam juga menyebabkan terjadinya pengendapan garam empedu yang diikuti penyerapan pewarna *neutral red*. Sehingga Koloni bakteri akan berwarna merah pada permukaannya. Basil tidak memfermentasi laktosa, maka tidak menghasilkan asam. Maka Koloni akan terlihat tidak berwarna atau transparan (Frankel *et al.*, 1970)

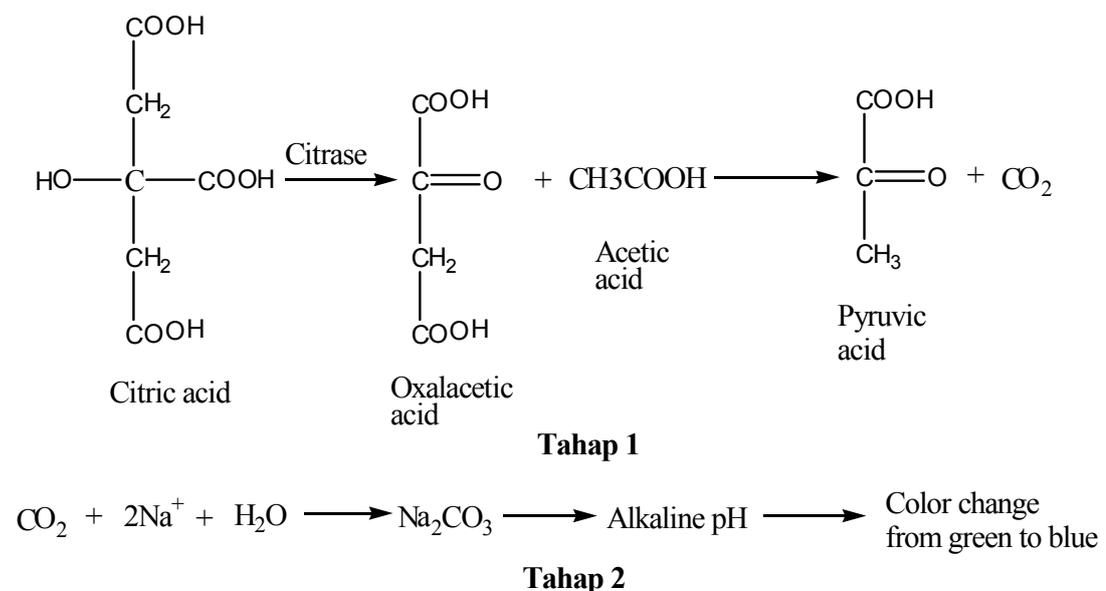
b. *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*

Medium TSIA merupakan medium yang digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasi gula. Medium TSIA mengandung 3 macam gula, yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Terdapat juga indikator fenol merah, serta FeSO_4 untuk memperlihatkan pembentukan H_2S yang ditunjukkan dengan adanya endapan hitam. Medium TSIA diinokulasikan dengan menusukkan ose sedalam $\frac{3}{4}$ medium lalu menggoreskannya pada bagian lereng media. Bila mikroorganisme hanya dapat memfermentasikan glukosa, maka

bagian dasar media akan berwarna kuning (bersifat asam) dan bagian lerengnya akan berwarna merah (bersifat basa). Bila mikroorganisme dapat memfermentasikan laktosa atau sukrosa atau keduanya, maka bagian lereng dan dasar media akan berwarna kuning (bersifat asam) serta bagian dasar media kadangkala terpecah akibat pembentukan gas seperti H₂ dan CO₂ (Frankel *et al.*, 1970).

c. *Simmon Citrat* (SC) agar miring.

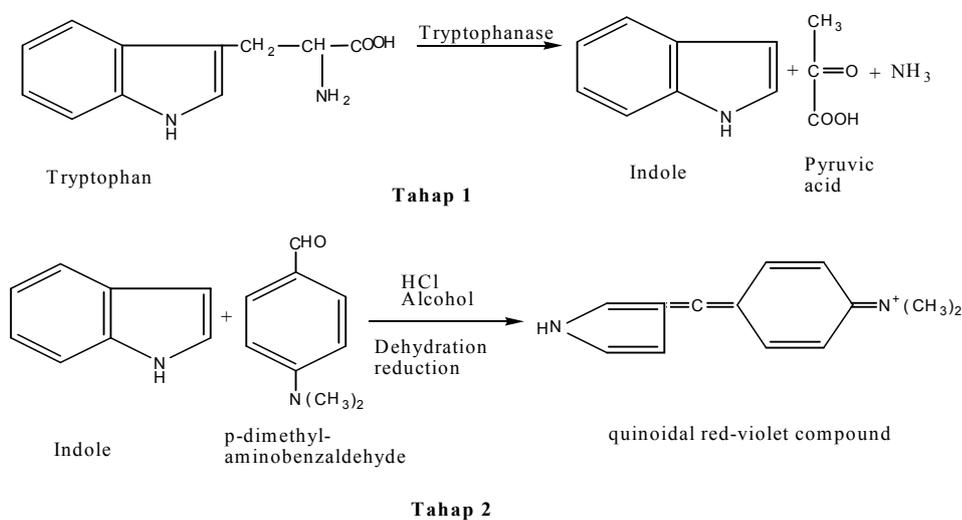
Simmon citrat agar merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH₄⁺ sebagai sumber N dan *brom thymol blue* sebagai indikator pH. Bila mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan bahwa mikroorganisme mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Frankel *et al.*, 1970).



Gambar 2. Reaksi Uji Sitrat

d. *Sulfur Indol Motility* (SIM)

Medium SIM merupakan medium semi solid yang digunakan untuk uji sulfur, indol dan motilitas bakteri. Pembentukan sulfur ditandai adanya warna hitam pada medium, sedangkan produksi Indol diketahui dengan adanya warna merah pada medium setelah ditambahkan reagen Kovac's yang berisi *paradimetil amino benzaldehid* (Gambar 3).



Gambar 3. Reaksi Uji Indol

Sedangkan motilitas bakteri terlihat adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar tusukan inokulasi. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel (Frankel *et al.*, 1970).

e. Urea agar miring

Medium Urea mengandung urea dengan indikator fenol red. Reaksi positif terjadinya warna merah keunguan pada medium, dengan demikian bakteri

mengubah urea menjadi 2 molekul ammonia dan CO₂ oleh enzim urease melalui reaksi hidrolisa. Ammonia dilepaskan ke dalam medium dan menaikkan pH. Bila pH basa maka fenol red akan berubah dari kuning menjadi merah keunguan (Frankel *et al.*, 1970).

f. Tes Oksidase

Tes oksidase merupakan tes reaksi biokimia untuk mengetahui kehadiran sitokrom oksidase, enzim ini kadang-kadang disebut indophenol oksidase. Dengan keberadaan organisme yang mengandung enzim sitokrom oksidase kertas yang tidak berwarna akan berubah menjadi biru violet (Shields and Cathcart, 2013).



Gambar 4. Tes Oksidase *Pseudomonas aeruginosa* (Shields and Cathcart, 2013)

Karakteristik pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara keseluruhan pada media perbenihan dan uji biokimianya tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada media perbenihan (Frankel *et al.*, 1970; Sumarno, 2000)

Kultur dan Bikomia	Hasil
Morfologi <i>Mac Conkey</i> Agar	Batang Gram negatif, tidak berspora dan berkapsul Koloni Sedang, jernih/keruh, smooth, kadang kadang sedikit kehijauan, keping tepinya tidak rata, tidak memfermentasi laktosa
Nutrient Agar TSIA	Tumbuh, pigmen hijau-biru Lereng merah, dasar merah, Sulfur negatif, gas negatif
<i>SIM</i>	Sulfur negatif, Indol negatif, motilitas positif
Urea	Positif
<i>Simons Citrat</i> Agar	Positif
Tes Oksidase	Positif

6. Pengobatan

Infeksi klinis oleh *Pseudomonas aeruginosa* sebaiknya tidak diterapi dengan obat tunggal, karena biasanya sulit sembuh dengan cara ini, dan karena bakteri dapat dengan cepat menjadi resisten jika menggunakan obat tunggal. Penisilin yang aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa* (tikarsilin, meslosilin, atau piperasilin) digunakan dengan kombinasi aminoglikosida, biasanya gentamicin, tobramisin, atau amikasin. Obat lain yang aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa* meliputi astreonam, imipenem, dan yang lebih baru kuinolon termasuk siprofloksasin. Sefalosporin yang baru, seftacidim dan sefoperazone, aktif melawan *P. aeruginosa*, Seftacidim digunakan sebagai pilihan utama pada terapi infeksi oleh *P. aeruginosa*. Profil kepekaan *P. aeruginosa* sangat beragam secara geografis, dan uji kepekaan seharusnya dikerjakan untuk membantu pemilihan terapi antimikroba (Brooks *et al.*, 2005 ; Todar, 2008).

7. Epidemiologi dan Pengendalian

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri patogen nosokomial utama. Karena *pseudomonas* tumbuh cepat dalam lingkungan yang lembab, perhatian khusus seharusnya diberikan pada bak cuci, bak mandi, penangas air, shower dan area basah lainnya. Untuk tujuan epidemiologik, galur bisa dibedakan berdasarkan piosin dan serotipe lipopolisakarida. Vaksin dari tipe yang tepat pada pasien dengan resiko tinggi, dapat mencegah sepsis akibat *pseudomonas*. Pengobatan seperti itu sudah digunakan sebagai percobaan pada pasien dengan leukemia, luka bakar, kistik fibrosis, dan imunosupresi (Brooks *et al.*, 2005 ; Todar, 2008)

B. Antibiotik

Antibiotik disebut juga sebagai antimikroba merupakan suatu substansi kimia yang diperoleh dari, atau dibentuk oleh berbagai spesies mikroorganisme, yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Dari sekian banyak antibiotika yang berhasil ditemukan hanya beberapa saja yang cukup tidak toksik untuk dapat dipakai dalam pengobatan (Chatim dan Suharto, 1993).

Antibiotik dapat diklasifikasikan berdasarkan :

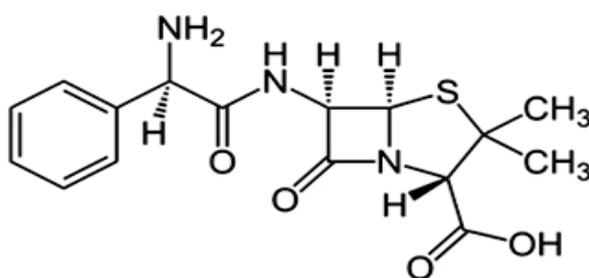
1. Berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotik menurut Brooks *et al.*, (2005); Pelczar *et al.*, (2008) dikelompokkan dalam 5 kategori yaitu :
 - a. Antibiotik yang menghambat metabolisme sel mikroba, termasuk dalam golongan ini adalah kontrimoksazol, sulfonamid, trimetopin, asam paraaminosilat (PAS) dan sulfon.

- b. Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel mikroba, termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin basitrasin, vankomisin, dan sikloserin.
 - c. Antibiotik yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba, termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien.
 - d. Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel mikroba, termasuk dalam kelompok ini adalah golongan aminoglikosida, makrolida, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol.
 - e. Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba, termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin, dan golongan kuinolon.
2. Berdasarkan struktur kimianya menurut Katzung (2004) antibiotik dikelompokkan sebagai berikut :
- a. Golongan β -laktam.
Golongan β -laktam akan mengganggu tahap akhir sintesa dinding sel. β -laktam akan mengikat enzim transpeptidase sehingga mencegah pembentukan dinding sel. Untuk menghindari kerusakan dinding sel, bakteri gram negatif membentuk enzim β -laktamase yang dapat memecah cincin β -laktam sehingga inaktif.
Turunan β -laktam dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :
 1. Turunan penisilin (ampisilin, amoksisilin).
 2. Turunan sefalosporin (cefoperazone, sefaleksim, sefuroksim)
 3. Turunan β -laktam non klasik (meropenem dan imipenem).

Struktur kimia Ampisilin

Rumus Molekul : $C_{16}H_{19}N_3O_4S$

Nama IUPAC : *(2S,5R,6R)-6-([(2R)-2-amino-phenylacetyl]amino)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid).*

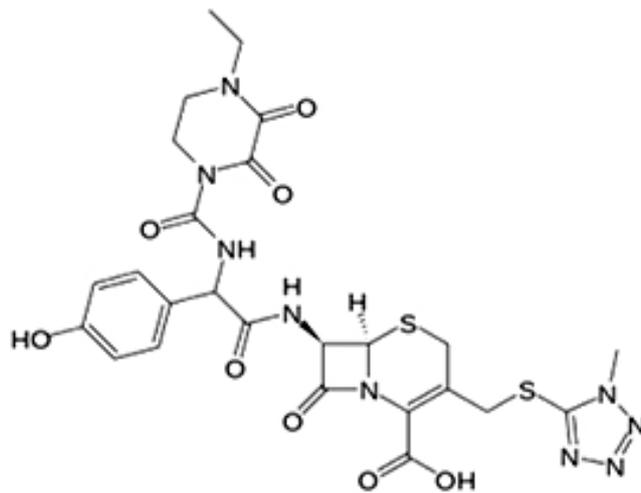


Gambar 5. Struktur kimia Ampisilin.

Struktur kimia Cepoperazone

Rumus Molekul : $C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$

Nama IUPAC : *(6R,7R)-7-[(2R)-2-{[(4-Ethyl-2,3-dioxopiperazin-1yl) carbonyl]amino}-2-(4-hydroxyphenyl)acetamido]-3-{[(1 methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)sulfanyl]methyl}-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0] oct-2-ene-2-carboxylic acid.*

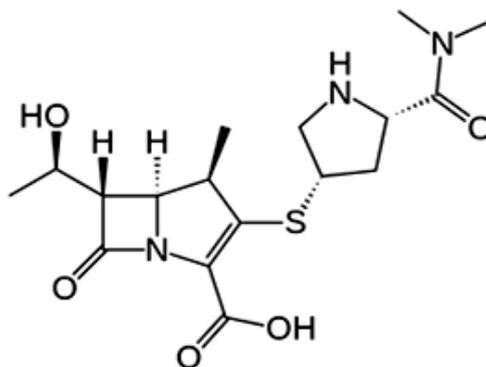


Gambar 6. Stuktur kimia Cepoperazone.

Contoh Struktur Meropenem

Rumus Molekul : $C_{17}H_{25}N_3O_5S$

Nama IUPAC : *3-[5-(dimethylcarbamoyl) pyrrolidin-2-yl] sulfanyl-6- (1-hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo- 1-azabicyclo[3.2.0] hept-2-ene-2-carboxylic acid.*



Gambar 7. Stuktur kimia Meropenem

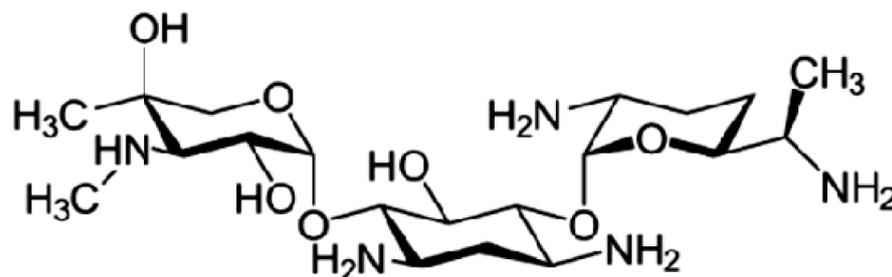
b. Golongan Aminoglikosida

Semua senyawa dan turunan semi sintetiknya mengandung 2 atau 3 gula-amino yang saling terikat secara glikosidis didalam molekulnya. Dengan adanya gugus amino zat-zat yang bersifat basa lemah dan garam sulfatnya digunakan dalam terapi muah larut dalam air. Yang termasuk golongan aminoglikosida diantaranya Gentamicin dan amikacin.

Struktur kimia Gentamicin

Rumus Molekul : $C_{21}H_{43}N_5O_7$

Nama IUPAC : *(3R,4R,5R)-2-{[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-{[(2R,3R,6S)-3-amino-6-[(1R)-1-(methylamino)ethyl]oxan-2-yl]oxy}-2-hydroxycyclohexyl]oxy}-5-methyl-4-(methylamino)oxane-3,5-diol.*



Gambar 8. Stuktur kimia Gentamicin.

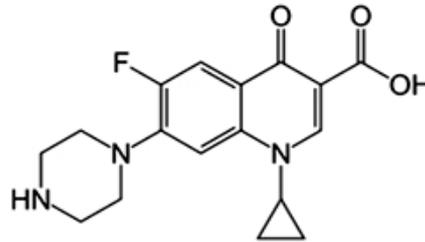
c. Golongan Kuinolon

Yang termasuk golongan kuinolon diantaranya siprofloksacin, asam nalidiksat, levofloksasin, dan trovafloksasin.

Contoh Struktur siprofloksacin.

Rumus Molekul : $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

Nama IUPAC : *1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-quinoline 3-carboxylic acid*



Gambar 9. Struktur kimia Siprofoxacin.

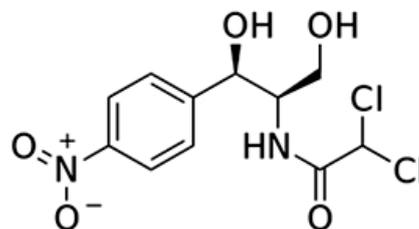
d. Golongan Sulfonamida

Yang termasuk golongan sulfonamida diantaranya kotrimoksazole, klorampenikol dan trimetropin.

Contoh Struktur Kloramfenikol.

Rumus Molekul : $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Nama IUPAC : *2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide.*



Gambar 10. Struktur kimia Kloramfenikol

e. Golongan Glikopeptida

Yang termasuk golongan glikopeptida diantaranya: vankomisin, telkoplanin, amoplanin, dan dekaplanin.

f. Golongan Poliketida

Yang termasuk golongan poliketida diantaranya golongan makrolida (eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin), golongan ketolida (telitromisin), golongan tetrasiklin.

Terapi dengan antibiotik adalah sebuah pengobatan yang cukup kompleks, karena melibatkan tiga faktor penting yaitu mikroba sendiri sebagai agen patogen, manusia yang diserangnya sebagai hospes dan jenis antibiotik yang dipakai untuk membunuh-agen patogen tersebut. Ketiga faktor itu saling berinteraksi sempurna dan menentukan kesembuhan suatu penyakit (Mulvey and Andrew, 2009).

C. Resistensi Terhadap Antibiotik

Berkembangnya resistensi terhadap obat-obatan hanyalah salah satu contoh proses alamiah yang tak pernah ada akhirnya yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru.

Resistensi terhadap obat pada suatu mikroorganisme dapat disebabkan oleh suatu faktor yang memang sudah ada pada mikroorganisme itu sebelumnya atau mungkin juga faktor itu diperoleh kemudian (Pelczar *et al.*, 2008 ; Gunawan dkk., 2009). Bakteri secara intrinsik resisten terhadap antibiotik tertentu tetapi juga dapat memperoleh resistensi melalui jalur mutasi pada gen kromosom atau transmisi vertikal dan transfer gen secara horizontal (Blair *et al.*, 2014). Menurut Dantas and Sommer (2014) Bakteri memperoleh sifat resistensi terhadap antibiotik berasal dari dua hal, yakni dengan cara transmisi vertikal dan transmisi horisontal. Pada transmisi vertikal, bakteri memperoleh kekebalan melalui akumulasi perubahan genetik selama proses alami duplikasi genom. Pada

transmisi horisontal terjadi transfer gen dari bakteri yang mengalami mutasi menjadi resisten. Penelitian terakhir menjelaskan bahwa transmisi horisontal ini berperan terhadap berkembangnya resistensi bakteri terhadap antibiotika.

Berkembangnya resistensi antibiotik di klinik menurut Gunawan dkk (2009) disebabkan beberapa faktor, antara lain :

1. Penggunaan antimikroba yang sering. Terlepas dari penggunaannya rasional atau tidak, antibiotik yang sering digunakan biasanya akan berkurang aktivitasnya.
2. Penggunaan antimikroba yang irrasional. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa penggunaan antimikroba yang irrasional, terutama di rumah sakit, merupakan faktor penting yang memudahkan berkembangnya resistensi kuman.
3. Penggunaan antimikroba baru yang berlebihan. Beberapa contoh antimikroba yang relatif cepat hilang efektifitasnya setelah dipanaskan karena masalah resistensi ialah siprofloksasin dan kotrimoksazol.
4. Penggunaan antimikroba untuk jangka waktu lama. Pemberian antimikroba dalam waktu lama memberi kesempatan bertumbuhnya kuman yang lebih resisten.
5. Penggunaan antimikroba untuk ternak. Kadar antibiotik yang rendah pada ternak memudahkan tumbuhnya kuman-kuman yang resisten.

Bakteri yang resisten terhadap antibiotik menjadi masalah kesehatan yang penting, terutama di rumah sakit dan sarana kesehatan. Bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat menyebabkan penyakit yang serius, mengancam jiwa dan sulit untuk diatasi karena terbatasnya pilihan terapi. *Multidrug resistant*

(MDR) adalah isolat resisten terhadap lebih dari atau sama dengan dua jenis antibiotik (Mulvey and Andrew, 2009).

Mikroorganisme dapat memperlihatkan resistensi terhadap obat-obatan melalui berbagai mekanisme. Menurut Dantas and Sommer (2014) dan Nugroho (2012) suatu bakteri dapat menjadi resisten terhadap suatu antibiotik diakibatkan :

1. Produksi enzim yang dapat menginaktivasi obat.

Strain resisten dari bakteri gram positif maupun gram negatif menghasilkan kloramfenikolasetil-transferase yang menginaktivasi kloramfenikol (Nugroho., 2012). Ampisilin dan Amoxisilin merupakan antibiotik golongan Penisilin yang sering digunakan. Resistensi bakteri terhadap golongan Penisilin dikarenakan beberapa bakteri mampu memproduksi enzim β *laktamase*. Enzim ini berfungsi menghidrolisis cincin β *laktam* dari Penisilin sehingga dapat menghancurkan aktifitas antibiotiknya (Brook *et al.*, 2005).

2. Perubahan area target yang menurunkan daya ikat antibiotik.

Perubahan protein sisi aktif pada sub unit 50S yang diperantarai plasmid mengakibatkan resistensi terhadap eritromisin. Perubahan DNA-dependen RNA polimerase akibat mutasi kromosomal mengakibatkan resistensi terhadap rifampisin (Nugroho., 2012).

3. Menurunkan akumulasi antibiotik intraseluler dengan cara menurunkan permeabilitas dan atau meningkatkan efluks aktif antibiotik.

Gen resisten dalam plasmid yang mengkode protein yang dapat terinduksi dalam membran bakteri, mengakibatkan proses efluks yang tergantung energi terhadap tetrasiklin (Nugroho, 2012).

4. Mengembangkan jalur lain menghindari reaksi yang dihambat oleh antibiotik. Contohnya adalah kasus resistensi bakteri terhadap trimetropim. Produksi dihidrofolat reduktase oleh plasmid yang tidak mempunyai afinitas terhadap trimetropim mengakibatkan resistensi terhadap antibiotik tersebut (Nugroho, 2012).

D. Uji Resistensi Antibiotik

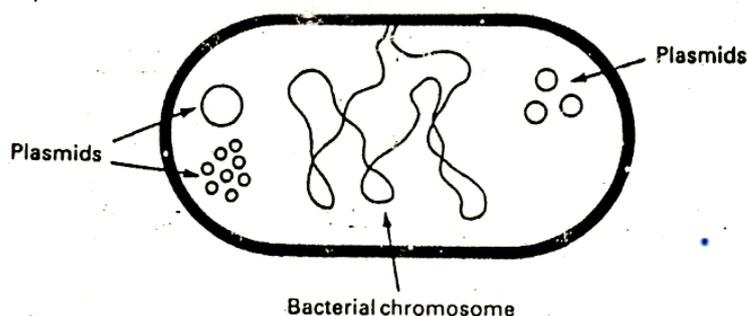
Uji resistensi antibiotik merupakan tes yang digunakan untuk menguji kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Uji kepekaan/Resisitensi/sensitivitas bertujuan mengetahui daya kerja dari suatu antibiotik dalam membunuh bakteri. Metode Kirby Bauer adalah uji sensitivitas dengan metode difusi agar menggunakan teknik *disc diffusion*, dalam uji sensitivitas menggunakan media selektif *Mueller Hinton Agar* (MHA). Mekanisme kerja metode Kirby Bauer dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dalam NaCl 0,85% steril, sehingga memiliki kekeruhan yang sama dengan standar *Mac Farlan* dengan konsentrasi kuman setara 10^8 CFU/ml. Suspensi bakteri tersebut diambil dan diratakan pada permukaan MHA, kemudian didiamkan untuk memberi kesempatan kepada bakteri meresap pada medium. Selanjutnya disc antibiotik ditempelkan pada medium tersebut dan diinkubasi pada 37°C selama 16-18 jam. Diameter zona hambatan yang berwarna jernih disekitar disk dengan menggunakan micrometer. Hasil pengukuran diameter zona hambatan dibandingkan dengan standar dengan kriteria resisten, Intermediet atau sensitif (Sumarno, 2000 ; CLSI, 2012).

Tabel 2. Interpretasi Zone Diameter Standar Antibiotik (CLSI., 2012)

Golongan	Antibiotik	Kode	Isi Disk	Resisten (mm)	Intermediet (mm)	Sensitif (mm)
Penisilin	Ampisilin	AMP	10µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Sefalosporin	Cefoperazone	CFP	75 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Carbapenem	Meropenem	MEM	10 µg	≤ 15	16-18	≥ 19
Aminoglikosida	Gentamicin	CN	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Sulfonamida	Kloramfenikol	C	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Kuinolon	Siprofloxacina	CIP	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21

E. Plasmid

Plasmid merupakan molekul DNA sirkuler yang berada dalam sel bakteri dan pada beberapa spesies eukarotik secara independen. Secara normal plasmid dapat membantu penyebaran sel inangnya, plasmid memiliki beberapa gen yang penting untuk mengatasi lingkungan tempat hidup inangnya. Sebagai contoh, R plasmid membawa gen yang menyebabkan resisten terhadap antibiotik, sehingga di alam, sel yang mengandung plasmid dapat bertahan hidup lebih baik (Brown, 2010).

**Gambar 11.** Plasmid dalam Bakteri (Brown ; 2010)

Plasmid dapat dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu konjugatif dan non konjugatif. Plasmid konjugatif ditandai oleh kemampuannya untuk memacu

konjugasi seksual diantara sel-sel bakteri. Konjugasi dan transfer plasmid diatur oleh gen transfer yang terdapat pada plasmid konjugatif tetapi tidak terdapat pada jenis nonkonjugatif. Meskipun demikian plasmid nonkonjugatif dapat ditranfer bersama plasmid konjugatif bila keduanya berada dalam sel yang sama (Brown, 2010).

Pada kenyataannya sel *E.coli* telah diketahui mengandung tujuh plasmid yang berbeda-beda. Untuk dapat berada dalam sel yang sama, plasmid-plasmid yang berbeda harus kompatibel. Jika dua plasmid ternyata tidak kompatibel, maka salah satu diantaranya akan cepat lenyap dari sel. Dasar inkompabilitas belum diketahui (Brown, 2010).

Plasmid adalah unsur genetik ekstrakromosomal yang terdapat di dalam berbagai spesies bakteri. Plasmid berupa molekul DNA sirkular yang tertutup, beruntai-ganda, dan besarnya bervariasi antara 1 kb sampai lebih dari 200 kb. Plasmid sering mengandung gen-gen yang mengkode untuk enzim, yang pada keadaan tertentu, penting untuk bakteri inang. Fenotip-fenotip yang ditunjukkan oleh plasmid adalah : resistensi terhadap antibiotik, kemampuan produksi antibiotik, degradasi senyawa organik yang kompleks, produksi colisin, produksi enterotoksin, dan produksi enzim restriksi serta enzim modifikasi (Brown, 2010).

Pada keadaan alami banyak plasmid dipindahkan ke inang yang baru dengan proses konjugasi. Namun di dalam laboratorium plasmid dapat dipindahkan ke bakteri dengan proses artefisial, yang disebut *transformasi*, yaitu plasmid dimasukkan ke beberapa sel untuk sementara permeabel terhadap molekul DNA yang kecil. Fenotip baru ditimbulkan oleh plasmid pada resipien (misalnya,

resistensi terhadap suatu antibiotik) memungkinkan untuk menyeleksi secara sederhana bakteri yang telah mengalami transformasi dengan baik (Brown, 2010).

1. Klasifikasi Plasmid

Sebagian besar klasifikasi plasmid berdasarkan karakteristik utama yang disandi gen plasmid. Menurut Brown (2010) ada 5 tipe klasifikasi plasmid yaitu:

- a. Fertiliti plasmid atau F plasmid yang hanya membawa gen tra yang memiliki karakteristik kemampuan untuk meningkatkan konjugasi transfer plasmid, contohnya F plasmid pada *E.coli*.
- b. Resistensi atau R Plasmid membawa gen yang menyebabkan bakteri resisten terhadap satu atau lebih antimikroba, seperti kloramfenikol, ampicilin dan mercury. R plasmid sangat penting bagi dunia mikrobiologi klinik karena kemampuannya menyebarkan bakteri. seperti ditemukan pada infeksi bakteri. Contohnya RP 4, umumnya ditemukan pada *Pseudomonas* tetapi juga muncul pada bakteri lain.
- c. Col Plasmid mengandung Colisin yaitu protein yang dapat membunuh bakteri yang lain, contohnya ColE 1 dari *E. coli*.
- d. Degradasi Plasmid membantu bakteri untuk memetabolisme molekul yang tidak biasa dimetabolisme seperti Toluena dan Asam Salisilat.
- e. Virulensi plasmid merupakan plasmid yang menyebabkan tumefasi yang menyerang jagung yang menyebabkan penyakit dikotiledon pada tanaman.

2. Isolasi Plasmid

Isolasi plasmid dapat dilakukan secara manual atau menggunakan Kit yang tersedia dari berbagai perusahaan biotechnology (*Thermo Scientific, Invitrogen, Qiagen, Macherey-Nagel, Integrated DNA Technology* dan *Geneaid*).

Metode isolasi plasmid menurut Sambrook and Russel (2001) dengan prinsip lisis alkali mempunyai tiga tahapan yaitu pelisisan dinding sel bakteri, denaturasi DNA kromosom, dan pemisahan DNA plasmid dari debris serta pengotor.

Larutan yang digunakan dalam metode ini terdiri dari lisis alkali I, II, III dan larutan *Phenol Chloroform Isoamylalkohol* (PCI).

Lisis alkali 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.

Lisis alkali II berfungsi sebagai pendenaturasi yang mengandung *Sodium dodesil sulfat* (SDS) berperan melarutkan lipid yang berasal dari membran sel dan protein sel, sedangkan Natrium hidroksida (NaOH) membuat pH menjadi basa sehingga mendenaturasi DNA kromosom. Campuran ini tidak boleh divortek karena dapat mendenaturasi DNA plasmid (Sambrook and Russel, 2001).

Lisis alkali III yang mengandung asam asetat glasial dan kalium asetat pada berperan sebagai penetral, pH kembali normal sehingga dapat merenaturasi rantai plasmid DNA, sedangkan kalium asetat mengendapkan SDS, lemak dan protein. Fungsi dari larutan PCI memisahkan DNA plasmid dari pengotor-pengotor seperti protein. Fenol melarutkan protein sedangkan kloroform memisahkan fenol dari fase air sehingga larutan menjadi 2 lapisan lapisan bawah

mengandung protein pengotor dan lapisan atas mengandung DNA plasmid (Sambrook and Russel, 2001).

F. Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik.

Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Pemberian aliran listrik dapat menyebabkan terjadi perpindahan aliran elektron dan zat objek, kemudian akan bergerak dari elektroda negatif ke arah sisi elektroda positif. Kecepatan pergerakan ini berbeda-beda, tergantung dari muatan dan berat molekul DNA. Kisi-kisi gel berfungsi sebagai pemisah. Objek yang dengan berat molekul lebih besar akan lebih lambat berpindah (Magdeldin, 2012).

Elektroforesis gel agarosa dapat digunakan secara efektif untuk mendeteksi dan karakterisasi awal DNA plasmid yang hadir dalam isolat klinis gram negatif. Metode ini sensitif dan tidak memerlukan radioisotop atau ultrasentrifugasi. Estimasi massa plasmid dari tingkat migrasi DNA dalam gel lebih baik dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dengan mikroskop elektron dari DNA plasmid dimurnikan dengan kepadatan keseimbangan sentrifugasi. Metode ini telah terbukti menjadi alat yang berguna untuk pekerjaan survei dan penyelidikan epidemiologi penyebaran plasmid, serta tambahan penting untuk analisis genetik plasmid (Meyers *et al.*, 1976).