

Isolasi dan Identifikasi Gen Resistensi Ciprofloxacin pada Isolat *Escherichia coli* MDR Ciprofloxacin dari Penderita ISK di RSUDAM Provinsi Lampung

Basuki Rachmad¹, Wiria Saputri², Yandri A.S³, Andi Setiawan³, Mulyono³

¹Magister Ilmu Biomedik FK Unsri

²Instalasi Laboratorium Mikrobiologi RSUDAM Provinsi Lampung

³FMIPA, Universitas Lampung

Abstrak

Peningkatan resistensi *Escherichia coli* terhadap antibiotik fluorokuinolon telah banyak dilaporkan di seluruh dunia. Sebanyak 30 isolat *E.coli* dari pasien ISK di RSUDAM Provinsi Lampung, ditemukan 18 isolat *E.coli* MDR mempunyai plasmid dan 73,3% resisten terhadap ciprofloxacin. Resistensi *E.coli* terhadap antibiotik fluorokuinolon (misal ciprofloxacin) umumnya disebabkan mutasi kromosom pada gen *gyrA* dan *parC*, dan adanya gen plasmid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen resistensi ciprofloxacin, baik yang terdapat pada DNA plasmid (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) yaitu *qnr*, *oqxA* dan *oqxB* maupun pada DNA kromosom (*Quinolone Resistance Determining Regions*) yaitu *gyrA* dan *parC*. Isolasi DNA plasmid dan kromosom dilakukan terhadap 18 isolat tadi menggunakan masing-masing kit yang sesuai. Keberadaan gen di dalam isolat dideteksi secara PCR menggunakan T100™ Thermal Cycler. Elektroforesis di dalam gel agarosa 1% dari ampikon menggunakan BIO-RAD™ PowerPac. Visualisasi ampikon dengan BIO-RAD™ UVITEC menghasilkan pita DNA fragmen gen *qnr* pada 593 bp (1 isolat), *oqxA* (866 bp, 2 isolat), *oqxB* (781 bp, 1 isolat), *gyrA* (191 bp, 18 isolat) dan *parC* (264 bp, 18 isolat). Dari data tersebut dapat diusulkan bahwa resistensi terhadap ciprofloxacin diduga kuat disebabkan oleh adanya gen resistensi ciprofloxacin, baik yang berlokasi di plasmid maupun kromosom. Sekuensing DNA disarankan untuk menentukan urutan basa-basa pada pita DNA yang dihasilkan sehingga pola mutasi pada gen-gen yang berkaitan dengan MDR dapat dipecahkan.

Kata Kunci : *E.coli* MDR ciprofloxacin, gen *qnr*, *gyrA*, *oqxAB*, *parC*.

Isolation and Identification of Ciprofloxacin Resistant Genes on Isolate *Escherichia coli* MDR Ciprofloxacin from ISK Patients in RSUDAM Lampung

Abstract

The increasing of *Escherichia coli* resistance to fluoroquinolone antibiotics has been widely reported around the world. A total of 30 *E.coli* isolates from patients with UTI in RSUDAM Lampung Province, was found 18 isolates of *E.coli* MDR have plasmid and 73.3% were resistant to ciprofloxacin. *E.coli* resistance to the antibiotic fluoroquinolone (eg ciprofloxacin) is generally caused by chromosomal mutations in genes *gyrA* and *parC*, and gene plasmid. This study aims to determine the presence of ciprofloxacin resistance gene, both contained in plasmid DNA (plasmid mediated quinolone resistance) is *qnr*, *oqxA* and *oqxB* and the chromosomal DNA (quinolone Resistance Determining Regions) is *gyrA* and *parC*. Isolation of plasmid and chromosomal DNA of the 18 isolates was performed using each kit accordingly. The existence of genes in the isolates were detected by PCR using Thermal Cycler T100™. Electrophoresis in 1% agarose gel of amplicons using BIO-RAD™ PowerPac. Visualization of amplicons with BIO-RAD™ UVITEC produce DNA gene fragments *qnr* at 593 bp (1 isolate), *oqxA* (866 bp, 2 isolates), *oqxB* (781 bp, 1 isolate), *gyrA* (191 bp, 18 isolates) and *parC* (264 bp, 18 isolates). From these data can be proposed that resistance to ciprofloxacin allegedly caused by the presence of ciprofloxacin resistance gene, both of which are located in the plasmid and chromosome. DNA sequencing is recommended to determine the sequence of bases on the tape produced so that the pattern of mutations in these genes are associated with MDR can be solved.

Keywords : *E.coli* MDR ciprofloxacin, gen *qnr*, *gyrA*, *oqxAB*, *parC*.

Korespondensi: Basuki Rachmad, alamat :Jl Srijaya, Bukit Tinggi, Palembang. E-mail: zahra_zaki0308@yahoo.co.id

Pendahuluan

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal usus, Gram-negatif dan berbentuk batang. Strain tertentu dari *E.coli* dapat menyebabkan infeksi usus atau di luar usus pada manusia atau hewan tertentu.¹ Misalnya *E.coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) yang merupakan penyebab utama infeksi nosokomial di rumah sakit.²

Antibiotik golongan fluorokuinolon yang terbanyak digunakan untuk pengobatan infeksi adalah *ciprofloxacin*, terutama infeksi saluran kemih (ISK) yang disebabkan oleh bakteri Gram-negatif khususnya *E.coli*.^{3,4,5} Fluorokuinolon dibuat dari kuinolon dengan modifikasi penambahan atom fluorin pada posisi C-6 dari molekul kuinolon sehingga dapat meningkatkan potensi dan spektrumnya terhadap bakteri *Enterobacteriaceae* Gram-

negatif.^{3,4} Generasi pertama kuinolon adalah *nalidixic acid* dan *oxolinic acid*. Karena itu ciprofloxacin banyak digunakan untuk berbagai macam infeksi, seperti infeksi saluran kemih (ISK), aliran darah, usus atau saluran pernafasan.⁵ Tetapi penggunaannya yang *over dosis* dan salah dapat mengarah ke munculnya resistensi ciprofloxacin, khususnya terhadap *Enterobacteriaceae* Gram-negatif.^{3,6} Infeksi yang sebelumnya direspons dengan baik oleh florokuinolon, sekarang ini telah meningkat menjadi risiko kegagalan pengobatan.^{1,7,8}

Resistensi *E.coli* terhadap antibiotik florokuinolon umumnya disebabkan mutasi kromosom pada gen *gyr A* dan *par C*.^{7,9,10} Tetapi baru-baru ini penelitian menunjukkan bahwa resistensi tingkat rendah dapat juga dimediasi oleh plasmid, melalui akuisisi gen *qnr* yang diperantarai oleh plasmid pMG252.⁹ Plasmid pertama kali dilaporkan pada 1998 di dalam isolat strain *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi pada 1994 di sebuah Rumah Sakit Birmingham Universitas Alabama, namun masih belum terdeteksi di dalam isolat yang berasal dari Amerika Selatan. Menurut Soulsby, faktor penentu resistensi bakteri terhadap antibiotik terdapat pada elemen yang bersifat genetik, yang terdiri dari resistensi kromosom dan ekstra-kromosom. Resistensi ekstra-kromosomal disandi oleh plasmid, dimana plasmid dapat menularkan resistensi kepada bakteri lain, sehingga bakteri di sekitarnya yang tadinya tidak resisten menjadi resisten. Saputri¹¹ mengatakan, bahwa analisis plasmid dapat digunakan sebagai sarana memberikan informasi tambahan dalam mendeteksi dan mengevaluasi penyebaran *multidrug resistance* (MDR).

Sementara di Indonesia, Samirah¹² menemukan 48% isolat *E.coli* resisten ciprofloxacin diantara 39 isolat positif *E.coli* dari pasien ISK di Makassar. Endriani¹³ melaporkan sebanyak 45,45% isolat *E.coli* resisten ciprofloxacin diantara 14 isolat positif *E.coli* dari pasien ISK di Pekanbaru. Prabowo dkk (2012) menemukan 55,56% isolat *E.coli* resisten ciprofloxacin diantara 18 isolat positif *E.coli* pada pasien ISK di Yogyakarta. Syafada dan Fenty (2013) menemukan sebanyak 55,4% (n=31) isolat bakteri Gram-negatif resisten ciprofloxacin (paling banyak *E.coli*) diantara 56

isolat positif bakteri Gram-negatif penyebab ISK di Yogyakarta.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Saputri¹¹ menemukan 30 isolat positif *E.coli* dari total 205 spesimen urin penderita ISK di RSUD Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. Uji kepekaan antibiotik terhadap 30 isolat tadi mendapatkan 73,3% *E.coli* resisten ciprofloxacin, selanjutnya isolasi plasmid dari isolat tersebut menemukan sebagian besar isolat (n=18) mempunyai plasmid dan pola resisten MDR (*multidrug resistance*). Berdasarkan hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa ada korelasi antara resistensi antibiotik ciprofloxacin dengan ditemukannya plasmid. Tetapi identifikasi gen resistensi ciprofloxacin yang diperantarai oleh plasmid dari isolat-isolat tersebut belum diteliti lebih lanjut. Penelitian lanjutan ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen resistensi ciprofloxacin, baik yang terdapat di dalam plasmid (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*, yaitu *qnr*, *oqxA* dan *oqxB*) maupun di dalam kromosom (*Quinolone Resistance Determining Regions*, yaitu *gyrA* dan *parC*) dari isolat *E.coli* MDR ciprofloxacin pada penderita ISK di RSUD Abdoel Moeloek Provinsi Lampung.

Metodologi

A. Alat dan Bahan

1) Alat

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah mikropipet (0,5-10 µl, 5-20 µl, 10-100 µl, 100-500 µl dan 100-1000 µl), 1 set *microtip* putih, kuning dan biru, *shaker*, *shaker orbital incubator*, otoklaf, inkubator, tabung *eppendorf* 1,5 ml dan 2,0 ml; rak tabung *eppendorf*, 1 set *PCR tube* 0,2 ml, rak tabung *PCR tube*, *vortex shaker*, mikrosentrifuga, labu ukur 50 ml dan 100 ml, *beaker glass* 50 ml, 100 ml dan 500 ml, neraca analitik, tabung reaksi 5 ml bertutup ulir, *freezer*, kulkas, *waterbath*, *microwave*, alat PCR alat T100™ *Thermal Cycler*, alat elektroforesis *BIO-RAD™ PowerPac*, seperangkat alat UV *BIO-RAD™ UVITEC*.

2) Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- a) Sampel 18 isolat *E.coli* MDR ciprofloxacin dari hasil penelitian Saputri dkk (2015) sebanyak 18.
- b) Reagensia isolasi plasmid (*Presto™ Mini Plasmid Kit*, 100 preps/kit, dari GENE AID).
- c) Reagensia isolasi DNA kromosom (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, 100 Isolations, dari PROMEGA).
- d) Primer gen **qnr** (PROMEGA) untuk amplifikasi dan *sequencing DNA* (Jacoby *et al*, 2003; Pereira *et al*, 2007):
 - (1) **QP1 – F** : 5'- GAT AAA GTT TTT CAG CAA GAG G - 3'
 - (2) **QP2 – R** : 5'- ATC CAG ATC GGC AAA GGT TA - 3'.
- e) Sepasang primer spesifik gen **oqxA** (PROMEGA) untuk amplifikasi dan *sequencing DNA* (Liu *et al*, 2011; 2012) yaitu :
 - (1) **OqxA – F** : 5'- CTT GCA CTT AGT TAA GCG CC - 3'
 - (2) **OqxA – R** : 5'- GAG GTT TTG ATA GTG GAG GTA GG - 3'.
- f) Sepasang primer spesifik gen **oqxB** (PROMEGA) untuk amplifikasi dan *sequencing DNA* (Liu *et al*, 2011; 2012) yaitu :
 - (1) **OqxB – F** : 5'- GCG GTG CTG TCG ATT TTA - 3'
 - (2) **OqxB – R** : 5'- TAC CGG AAC CCA TCT CGA T - 3'.
- g) Sepasang primer spesifik gen **gyrA** (PROMEGA) untuk amplifikasi dan *sequencing DNA* pada 191 bp (Everett *et al*, 1996; Liu *et al*, 2012) yaitu :
 - (1) **gyrA – F** : 5'- ACG TAC TAG GCA ATG ACT GG - 3'
 - (2) **gyrA – R** : 5'- AGA AGT CGC CGT CGA TAG AA - 3'
- h) Sepasang primer spesifik gen **parC** (PROMEGA) untuk amplifikasi dan *sequencing DNA* pada 264 bp (Everett, *et al*, 1996; Liu *et al*, 2012) yaitu :
 - (1) **parC – F** : 5'- TGT ATG CGA TGT CTG AAC TG - 3'
 - (2) **parC – R** : 5'- CTC AAT AGC AGC TCG GAA TA - 3'
- i) Bahan-bahan lain yang dibutuhkan :
 - (1) Media *Luria Berthani broth*.
 - (2) *Green GoTaq® Master Mix Kit* (untuk 100 tes).
 - (3) Agarose.
 - (4) TBE Buffer 10X.

- (5) Isopropanol.
- (6) Alkohol absolut.
- (7) Alkohol 70%

B. Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah :

1) Persiapan Isolasi Plasmid

Kultivasi pada media *Luria Berthani* cair dilakukan dengan cara : ambil 50 µL suspensi bakteri dari kultur stok dengan mikropipet, masukkan ke dalam *Luria Berthani* cair 5 mL dalam tabung reaksi yang mengandung ciprofloxacin (MIC 4 – 50 ng/mL), lalu inkubasi pada *shaker orbital incubator* 37 °C selama 16 jam (*overnight*). Suspensi bakteri siap dilakukan isolasi plasmid.

2) Isolasi DNA Plasmid Isolat *E.coli*

Isolasi plasmid bakteri menggunakan *Presto™ Mini Plasmid Kit* (GENE AID). Tahapan kerja kit tersebut menggunakan prinsip metode *alkaline lysis solution* (Sambrook *et al*, 1989). Proses isolasi plasmid dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

a) Pemanenan

- (1) Pipet 1,5 ml kultur sel bakteri di dalam media *Luria Berthani* cair, masukkan ke dalam sebuah tabung mikrosentrifuga 1,5 ml.
- (2) Sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 – 16.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar untuk membentuk pelet sel.
- (3) Buang supernatan yang mengandung sisa media.
- (4) Ulangi lagi prosedur 1 – 3, sampai kultur sel di dalam media *Luria Berthani* habis. Lalu akan didapatkan pelet sel.

b) Resuspensi Sel

- (1) Campurkan 200 µL reagen *PD1 buffer* (pastikan *Rnase A* telah ditambahkan dalam reagen *PD1 buffer* tadi) dan 2 µL *Trueblue lysis buffer* ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang baru, lalu kocok dengan pelan-pelan.
- (2) Pipet campuran tadi ke dalam tabung mikrosentrifuga yang mengandung pelet sel, lalu vortex sampai larut.

c) Pemecahan / Pelisisan Sel

- (1) Tambahkan 200 ml reagen *PD2 buffer* untuk campuran yang telah diresuspendi tadi, lalu aduk dengan membolak-balik tabung sebanyak 10 kali. Jangan divortex untuk menghindari geseran DNA genom.
- (2) Diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 menit untuk memastikan lisat yang homogen. Tidak melebihi 5 menit.
- (3) Tutup segera botol *PD2 Buffer* setelah digunakan untuk menghindari pengasaman CO₂.

d) Netralisasi

- (1) Tambahkan 300 µl reagen *PD3 buffer* lalu bolak-balik dengan cepat 4 – 6 kali (jangan divortex). Setelah menambahkan *PD3 buffer*, suspensi menjadi tidak berwarna.
- (2) Sentrifugasi 14.000 – 16.000 x g selama 3 menit di suhu kamar.

e) Pengikatan DNA

- (1) Pipet supernatan tadi lalu masukkan ke dalam tabung *PD column*.
- (2) Sentrifugasi 14.000 – 16.000 x g selama 30 detik – 1 menit pada suhu kamar. Selama sentrifugasi, tabung *PD column* harus diletakkan di dalam *Collection tube 2 ml* (tabung mikrosentrifuga 2 ml).
- (3) Lalu buang larutan di dalam *Collection tube 2 ml*.
- (4) Letakkan kembali *PD column* ke dalam *Collection tube 2 ml*.

f) Pencucian

- (1) Tambahkan 400 µl *W1 buffer* ke dalam tabung *PD column*. Sentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g. Lalu buang larutan di dalam tabung *Collection tube 2 ml*. Letakkan kembali tabung *PD column* didalam tabung *Collection tube 2 ml*.
- (2) Tambahkan 600 µl *Wash buffer* (pastikan etanol absolut telah ditambahkan di dalam botol *Wash buffer*) ke dalam tabung *PD column*.
- (3) Sentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g selama 30 detik – 1 menit. Lalu

buang larutan di dalam tabung *Collection tube 2 ml*. Letakkan kembali tabung *PD column* didalam tabung *Collection tube 2 ml*.

- (4) Sentrifugasi lagi pada 14.000 – 16.000 x g selama 3 menit untuk mengeringkan matriks *PD column* (tujuannya untuk menghilangkan residu *Wash buffer*).
- (5) Pindahkan tabung *PD column* yang telah kering ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang baru.

g) Proses Elusi

- (1) Tambahkan 50 µL reagen *Elution buffer* ke tengah-tengah matriks *PD Column*.
- (2) Diamkan 2 menit agar reagen *Elution buffer* terserap sempurna.
- (3) Sentrifugasi 14.000 – 16.000 x g selama 2 menit.
- (4) Hasil isolasi DNA plasmid dapat diperiksa dengan teknik PCR dan elektroforesis.

3) Isolasi DNA Kromosom Isolat *E.coli*

Isolasi DNA kromosomal dari bakteri *E.coli* menggunakan *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA).

a) Tahap Penyiapan Pelet Sel

- (1) Tambahkan 1 ml kultur bakteri semalam (*overnight*) ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml.
- (2) Sentrifugasi di kecepatan 13.000 – 16.000 x g selama 2 menit untuk membuat pelet sel. Buang supernatan.
 - i) Untuk bakteri Gram Positif, lanjutkan ke Langkah 3.
 - ii) Untuk bakteri Gram Negatif, langsung ke Langkah 6.
- (3) Suspensikan kembali pelet sel secara menyeluruh di dalam 480 µl EDTA (*ethylene diamine tetrachloride*) 50 mM.
- (4) Tambahkan enzim litik yang sesuai kepada pelet sel yang di-resuspendikan tadi dalam volume total 120 µl, dan pipet dengan pelan-pelan untuk mencampur.
- (5) Inkubasi sampel pada 37 °C selama 30 – 60 menit. Sentrifugasi selama 2 menit pada 13.000 – 16.000 x g dan buang supernatan.

b) Tahap Pelisisan Sel

- (6) Tambahkan 600 µl reagen *Nuclei lysis solution*. Resuspensi dengan mikropipet pelan-pelan sampai sel tersuspensi kembali.
- (7) Inkubasi pada suhu 80 °C di dalam *waterbath* selama 5 menit untuk melisis sel; kemudian dinginkan pada suhu kamar.
- (8) Tambahkan 3 µl reagen *RNase solution* ke dalam lisat sel. Bolak-balikkan tabung pelan-pelan sebanyak 2 – 5 kali untuk mencampur.
- (9) Inkubasi pada suhu 37 °C di dalam *waterbath* selama 15 – 60 menit. Dinginkan sampel pada suhu kamar.

c) Tahap Pengendapan Protein

- (10) Tambahkan 200 µl reagen *Protein precipitation solution* ke dalam lisat sel yang telah ditambah *RNase*. Vortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik.
- (11) Inkubasi sampel pada es selama 5 menit.
- (12) Sentrifugasi pada 13.000 – 16.000 × g selama 3 menit.

d) Rehidrasi dan Presipitasi DNA

- (13) Pindahkan supernatan yang mengandung DNA ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml bersih yang mengandung 600 µl *Isopropanol* suhu ruangan.
- (14) Campur pelan-pelan dengan membolak-balik tabung sampai untai DNA yang seperti benang membentuk massa yang dapat dilihat.
- (15) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 – 16.000 × g selama 2 menit.
- (16) Dengan hati-hati tuangkan supernatan dan kuras / tiriskan tabung di atas kertas tisu bersih. Tambahkan 600 µl etanol 70% suhu kamar dan bolak-balikkan pelan-pelan tabung beberapa kali untuk mencuci pelet DNA.
- (17) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 – 16.000 × g selama 2 menit. Dengan hati-hati sedot / isap etanol.
- (18) Kuras / tiriskan tabung di atas kertas tisu bersih, sehingga memungkinkan pelet mendapat udara kering selama 10 – 15 menit.

- (19) Tambahkan 100 µl dari reagen *DNA rehydration solution* ke dalam tabung dan rehidrasi DNA dengan menginkubasi pada 65 °C di dalam *waterbath* selama 1 jam. Campur larutan secara periodik dengan pelan-pelan menekan tabung. Atau cara lain, rehidrasi DNA dengan menginkubasi larutan campuran selama semalam pada suhu kamar atau pada suhu 4 °C.
- (20) Simpan DNA pada 2 – 8 °C.

4) Uji PCR

a) Deteksi PCR untuk Gen qnr

- (1) Gen diamplifikasi dengan menggunakan Primer **QP1** : 5'- GAT AAA GTT TTT CAG CAA GAG G - 3' dan Primer **QP2** : 5'- ATC CAG ATC GGC AAA GGT TA - 3' untuk menghasilkan pita 593 bp (Jacoby *et al*, 2003; Pereira *et al*, 2007).
- (2) Program :
 - (a) Denaturasi awal 94 °C selama 5 menit.
 - (b) Siklus amplifikasi diulang 30 kali terdiri dari :
 - (i) Denaturasi 94 °C, 60 detik (1 menit).
 - (ii) *Annealing* 57 °C, 30 detik.
 - (iii) Ekstensi 72 °C, 60 detik (1 menit).
 - (c) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 5 menit.

b) Deteksi PCR untuk gen oqxA:

- (1) Gen diamplifikasi dengan menggunakan Primer **OqxA-F** : 5'- CTT GCA CTT AGT TAA GCG CC - 3' dan Primer **OqxA-R** : 5'- GAG GTT TTG ATA GTG GAG GTA GG - 3' untuk menghasilkan pita 866 bp (Liu *et al*, 2011; 2012).
- (2) Program :
 - (a) Siklus amplifikasi diulang 34 kali terdiri dari :
 - (i) Denaturasi 94 °C, 45 detik.
 - (ii) *Annealing* 57 °C, 45 detik.
 - (iii) Ekstensi 72 °C, 60 detik (1 menit).
 - (b) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 5 menit.

c) Deteksi PCR untuk gen *oqxB*:

(1) Gen diamplifikasi dengan menggunakan Primer **OqxB-F** : 5'-GCG GTG CTG TCG ATT TTA - 3' dan Primer **OqxB-R** : 5'-TAC CGG AAC CCA TCT CGA T - 3' untuk menghasilkan pita 781 bp (Liu *et al*, 2011; 2012).

(2) Program :

(a) Siklus amplifikasi diulang 34 kali terdiri dari :

- (i) Denaturasi 94 °C, 45 detik.
- (ii) *Annealing* 57 °C, 45 detik.
- (iii) Ekstensi 72 °C, 60 detik (1 menit).

(b) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 5 menit.

d) Deteksi PCR untuk Gen *gyrA* :

(1) Gen diamplifikasi dengan menggunakan primer **gyrA** (F) : 5'-ACG TAC TAG GCA ATG ACT GG - 3' dan primer **gyrA** (R) : 5'-AGA AGT CGC CGT CGA TAG AA - 3' untuk menghasilkan pita 191 bp (Everett *et al*, 1996; Liu *et al*, 2012).

(2) Program :

(a) Denaturasi awal 94 °C selama 5 menit.

(b) Siklus amplifikasi diulang 30 kali terdiri dari :

- (i) Denaturasi 94 °C, 60 detik (1 menit).
- (ii) *Annealing* 55 °C, 60 detik (1 menit).
- (iii) Ekstensi 72 °C, 60 detik (1 menit).

(c) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 10 menit.

e) Deteksi PCR untuk Gen *parC* :

(1) Gen diamplifikasi dengan menggunakan primer **parC** (F) : 5'-IGT ATG CGA TGT CTG AAC TG - 3' dan **parC** (R) : 5'-CTC AAT AGC AGC TCG GAA TA - 3' untuk menghasilkan pita 264 bp (Everett *et al*, 1996; Liu *et al*, 2012).

(2) Program :

(a) Denaturasi awal 94 °C selama 5 menit.

(b) Siklus amplifikasi diulang 30 kali terdiri dari :

(i) Denaturasi 94 °C, 60 detik (1 menit).

(ii) *Annealing* 55 °C, 60 detik (1 menit).

(iii) Ekstensi 72 °C, 60 detik (1 menit).

(c) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 10 menit.

5) Elektroforesis

a) Pembuatan Gel Agarosa 1 % :

(1) Timbang sebanyak 1 gram bubuk agarosa, masukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi 50 ml larutan TBE 1x.

(2) Homogenkan campuran bubuk agarosa dan buffer TBE 1x tadi di dalam *microwave* selama 1,5 menit sampai larutan berwarna bening.

(3) Jika campuran sudah bening, keluarkan dari dalam *microwave* dan dalam kondisi masih panas tambahkan etidium bromida 5 µL (hati-hati etidium bromida karsinogenik, gunakan jas lab, masker dan sarung tangan selama bekerja di lab!).

b) Proses Elektroforesis :

(1) Pipet @ sebanyak 5 µl sampel ampikon PCR (dari dalam *microtube* PCR) dan masukkan ke dalam masing-masing sumur gel tadi. Buat peta sampel dahulu sebelum memasukkan sampel.

(2) Pipet 3,5 µl *marker DNA ladder* 100 bp dan masukkan ke dalam sumur yang memang disiapkan untuk *marker*. Catatan : *Marker DNA ladder* yang dipakai tergantung dari *base pairs* sampel ampikon yang diharapkan, apakah 100, 200, 500 atau 1000 bp.

(3) Setel alat elektroforesis *BIO-RAD™ PowerPac* pada :

(a) Tegangan : 80-100 Volt

(b) Ampere : 400 mA

(c) Waktu : 25-30 menit

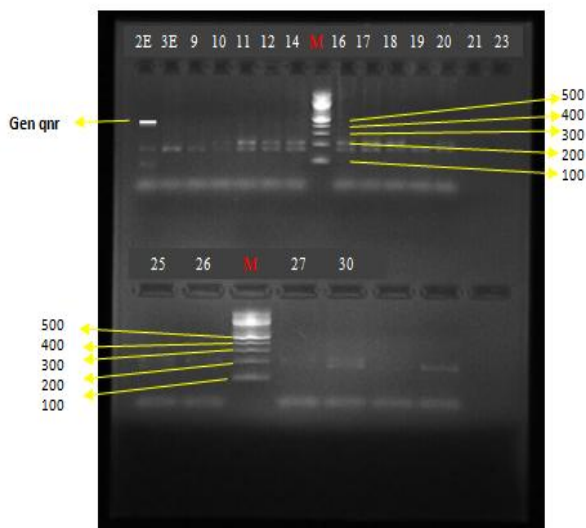
(4) Setelah proses elektroforesis selesai, angkat gel lalu masukkan ke dalam alat UV.

6) Visualisasi Hasil PCR

- Masukkan gel ke dalam alat UV *BIO-RAD™ UVITEC*. Tunggu beberapa detik sampai gambar gel muncul di layar monitor.
- Setel alat *BIO-RAD™ UVITEC* dengan komputer untuk mendapatkan kontras gambar yang bagus.
- Amati pita-pita fragmen DNA yang terbentuk dari setiap sampel ampikon dan tentukan posisi atau letaknya, apakah sejajar dengan garis pita *base pairs* di 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 atau 1000 bp dari pita *marker DNA ladder*.
- Hasil visualisasi pita DNA dari setiap sampel ampikon, simpan di komputer.

Hasil

A. Gen PMQR



Gambar 1. Visualisasi ampikon gen *qnr* pada band DNA di ukuran 593 bp. Cuma 1 isolat positif (sampel no.2E).

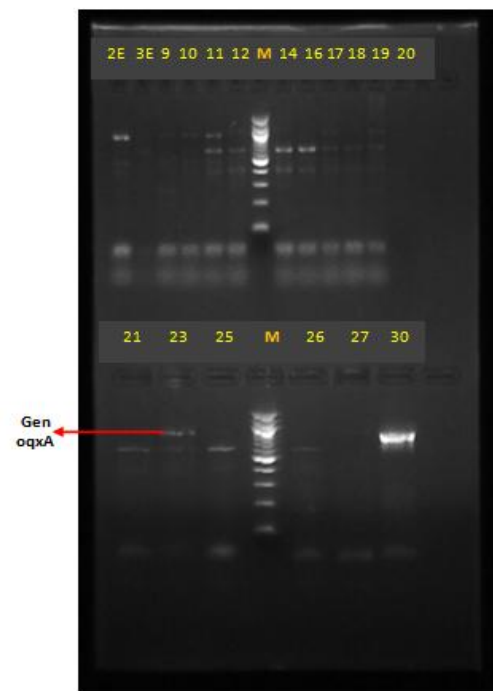
1) Gen *qnr*

Dari 18 isolat klinik *E.coli* MDR ciprofloxacin yang diperoleh dari pasien-pasien ISK di RSUDAM Provinsi Lampung, ditemukan 1 isolat sampel (no.2E) yang mempunyai gen *qnr*, berdasarkan pita DNA pada ukuran 593 bp (gambar 1).

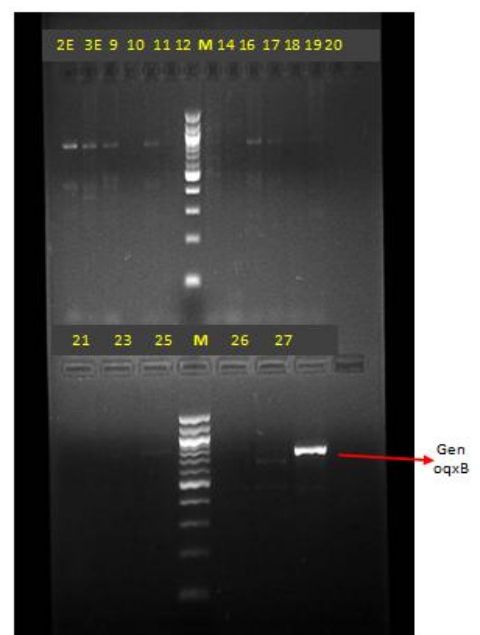
2) Gen *oqxAB* (*oqxA* dan *oqxB*)

Sebanyak 18 isolat klinis *E.coli* resisten ciprofloxacin yang akan prevalensi gen *oqxA* sebesar 5,5% dari 18 isolat klinik tersebut. g berasal dari penderita infeksi saluran kemih di RSUDAM Provinsi Lampung, diskriminasi dengan PCR untuk mencari gen *oqxA*. Hasilnya

ditemukan sebanyak 2 isolat positif gen *oqxA*, yaitu sampel no.23 dan 30, berdasarkan pita-pita DNA pada ukuran 866 bp (gambar 2). Sementara itu isolat yang positif gen *oqxA* ini juga diuji untuk gen *oqxB*. Hasil skrining PCR pada gen *oqxB* pada 18 isolat klinik tersebut menemukan sebanyak 1 isolat positif gen *oqxB*, yakni sampel no 30, berdasarkan pita-pita DNA pada ukuran 781 bp (gambar 3), dapat dikatakan prevalensi gen *oqxB* sebesar 5,5% dari 18 isolat klinik tersebut.



Gambar 2. Visualisasi ampikon gen *oqxA* pada band DNA di ukuran 866 bp (sampel no.23 dan 30)

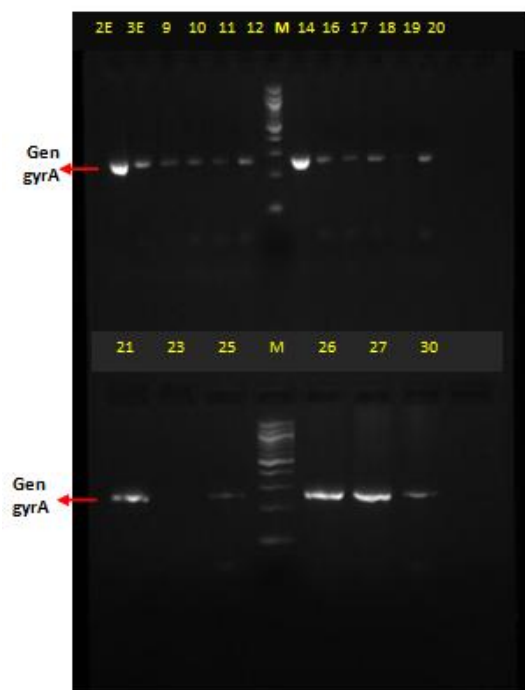


Gambar 3. Visualisasi ampikon gen *oqxB* pada band DNA di ukuran 781 bp (sampel no.30).

B. Gen QRDRs (*Quinolone Resistance Determining Regions*)

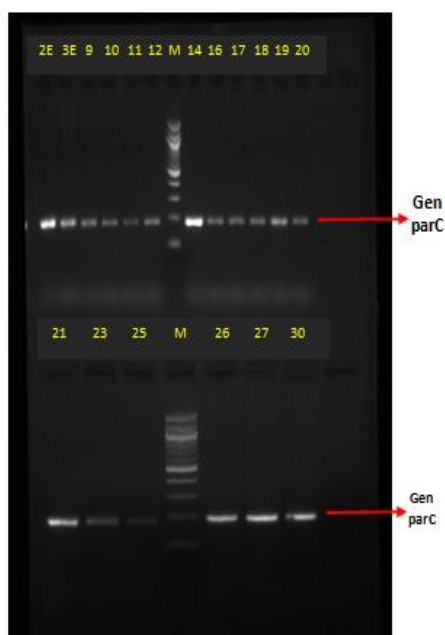
1) Gen *gyrA*

Berdasarkan ukuran pita DNA pada 264 bp, maka dari 18 isolat klinik *E.coli* MDR ciprofloxacin ditemukan hampir isolat positif gen *gyrA*, kecuali sampel no 23 (gambar 4).



Gambar 4. Visualisasi amplikon gen *gyrA* pada band DNA di ukuran 264 bp (semua sampel positif).

Berdasarkan ukuran pita DNA pada 191 bp, maka dari 18 isolat klinik *E.coli* MDR ciprofloxacin ditemukan semua isolat positif gen *parC* (gambar 5).



Gambar 5. Visualisasi amplikon gen *parC* pada band DNA di ukuran 191 bp (semua sampel positif).

Pembahasan

Ditemukan 1 isolat sampel (no.2E) yang mempunyai gen *qnr*, berdasarkan pita DNA pada ukuran 593 bp (gambar 1). Hasil ini sesuai dengan penelitian :

- Pereira,⁹ menemukan 1 gen *qnr* dari 144 isolat klinik *E.coli* resisten ciprofloxacin, dimana 76,4% dari 144 isolat tersebut didapat dari pasien ISK di RS Brazil;
- Jacoby,¹⁴ menemukan 1 gen *qnr* dari 91 isolat klinik *E.coli* resisten ciprofloxacin dari pasien-pasien ISK di Amerika Serikat;
- Wang,¹⁵ menemukan prevalensi rendah (8%) dari genotipe (gen *qnr*) ini di antara isolat *E. coli* resisten ciprofloxacin dosis tinggi.

Meskipun gen *qnr* jarang ditemukan di antara isolat *Escherichia coli* resisten ciprofloxacin, tetapi teridentifikasinya dapat menunjukkan adanya mekanisme resistensi terhadap fluorokuinolon.⁹ Gen *qnr* hanya memberikan resistensi level rendah terhadap fluorokuinolon; namun gen ini dapat menyebarkan secara horizontal di antara bakteri *E.coli* lainnya dan memfasilitasi seleksi mutan yang resisten setelah paparan *Ciprofloxacin*. Gen-gen PMQR dapat memberikan resistensi tingkat rendah ke kuinolon dan mempromosikan seleksi strain resistensi tingkat tinggi dengan mutasi pada kromosom.¹⁶ Mekanisme gen *qnr* dalam menyebabkan resistensi terhadap ciprofloxacin dapat dijelaskan sebagai berikut : protein Qnr (yang dikode gen *qnr*) berperan untuk melindungi enzim target DNA gyrase (yang dikode gen *gyrA*) dan topoisomerase IV (yang dikode gen *parC*) pada *E.coli* dari penghambatan ciprofloxacin. Hal ini menyebabkan ciprofloxacin tidak dapat mengikat enzim DNA gyrase dan topoisomerase IV, sehingga replikasi DNA pun tetap berjalan.^{17,18}

Ditemukan sebanyak 2 isolat positif gen *oqxA*, yaitu sampel no.23 dan 30, berdasarkan pita-pita DNA pada ukuran 866 bp (gambar 2). Sementara itu isolat yang positif gen *oqxA* ini juga diuji untuk gen *oqxB*. Hasil skrining PCR pada gen *oqxB* pada 18 isolat klinik tersebut menemukan sebanyak 1 isolat positif gen *oqxB*, yakni sampel no 30, berdasarkan pita-pita DNA pada ukuran 781 bp (gambar 3),

dapat dikatakan prevalensi gen *oqx*B sebesar 5,5% dari 18 isolat klinik tersebut.

Prevalensi gen *oqx*AB pada penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian dari :

- Kim¹⁹ yang menemukan prevalensi gen *oqx*A dan *oqx*B pada isolat klinik *E.coli* sebesar 0,4% dari 261 isolat.
- Ciesielczuk²⁰ yang menemukan prevalensi gen *oqx*AB sebesar 0,6% di dalam 65 isolat *E.coli* resisten ciprofloxacin.
- Yuan²¹ yang mengatakan prevalensi gen *oqx*A and *oqx*B adalah sebesar 6,6% (9) dari 136 isolat klinik *E.coli* resisten ciprofloxacin.

Keberadaan gen-gen PMQR (misalnya *qnr*, *oqx*A, *oqx*B) yang terletak di dalam plasmid pada bakteri *E.coli* memang jarang dan hanya memberikan resistensi level rendah, tetapi mereka dapat menularkan atau menyebarkan sifat resistensi ini secara horizontal di antara kuman *E.coli* lainnya dan memfasilitasi seleksi mutan resisten setelah terpapar ciprofloxacin.

Hal ini dikarenakan sifat plasmid, yang menurut Kocsis,¹⁷ bahwa plasmid didefinisikan sebagai molekul DNA sirkular, beruntai ganda (*double-stranded*), terletak di luar kromosom bakteri (ekstra-kromosomal) dan mampu bereplikasi secara otonom serta memiliki peran penting dalam penyebaran gen resistensi seperti gen ESBL (*extended-spectrum beta-laktamase*) dan gen PMQR dari bakteri *Enterobacteriaceae spp.*

Mekanisme resistensi yang disebabkan oleh gen-gen PMQR ini (*qnr*, *oqx*A dan *oqx*B) adalah :

- 1) Gen *qnr* melalui mekanisme perubahan target. Yakni dengan melindungi enzim DNA gyrase dan topoisomerase IV dari penghambatan fluorokuinolon.

Gen *oqx*AB melalui aktivasi pompa efflux. Yakni dengan meningkatkan efflux yang dihasilkan oleh pompa *Qep*AB dan *Oqx*AB, akibatnya terjadi penurunan akumulasi ciprofloxacin karena dipompa keluar sel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua isolat *E.coli* MDR ciprofloxacin mempunyai gen *gyr*A dan *par*C pada kromosomnya, yakni pada daerah penentu resistensi kuinolon atau QRDR (*Quinolone Resistance Determining Regions*). QRDR adalah bagian permukaan tempat pengikatan DNA dari enzim DNA gyrase (yang dikode oleh

gen *gyr*A) dan enzim Topoisomerase IV (yang dikode oleh gen *par*C) dimana substitusi asam amino dapat mengurangi pengikatan kuinolon / fluorokuinolon. Umumnya, beberapa mutasi diperlukan untuk mencapai resistensi yang penting secara klinis di dalam *Enterobacteriaceae spp*; kuman yang resisten kuinolon hampir selalu ditemukan memiliki satu atau lebih mutasi QRDR.¹⁷

Simpulan

Semua isolat (18 sampel) mempunyai gen kromosom (QRDR) yaitu *gyr* A dan *par*C, sedangkan yang positif mengandung gen plasmid (PMQR) sebanyak 3 isolat, yaitu isolat no.2E (positif gen *qnr*), no.23 (positif *oqx*A) dan no.30 (positif *oqx*A dan *oqx*B). Gen PMQR seperti *qnr*, *oqx*A dan *oqx*B di dalam 18 isolat *E.coli* MDR ciprofloxacin memang jarang ditemukan, tetapi keberadaannya dapat menularkan atau menyebarkan sifat resistensi ini secara horizontal di antara kuman *Enterobacteriaceae* lainnya dan memfasilitasi seleksi mutan resisten setelah terpapar ciprofloxacin. Gen QRDR seperti *gyr*A dan *par*C adalah gen normal yang terdapat di dalam isolat klinik *E.coli* MDR ciprofloxacin.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada dr. Dwi Handayani, M.Kes dan analis di Laboratorium Biomolekuler FK Unsri yang telah membantu dalam penelitian penulis.

Daftar Pustaka

1. Hopkins, K.L., Davies, R.H., EJ. Threfall. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* : recent development. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25(5):358-73.
2. Karlowsky, J.A, Kelly, J.L., Thornberry, M.E., Jones., Sahm, D.F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female out-patients in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 1(1):1-4.
3. Jaktaji RP, Ebadi R, Karimi M. Study of Organic Solvent Tolerance and Increased Antibiotic Resistance Properties in *E. coli*

- gyrA Mutants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2012; 11(2):595-600.
4. Peterson, U., Schemke, T. Quinolone structures and characteristics. Springer-Verlag, Berlin. 1998; 63:118.
5. Davis, R., Markham, A., Balfour, J.A. Ciprofloxacin : An updated and review of its pharmacology , therapeutic efficacy and tolerability. Drugs. 1996; 51(6):1019-74.
6. Aguiar, J.M., Chacon, R., Canton, F., Baquero. The emergency of highly flouroquinolone-resistant Escherichia colo in community-acquaired urinary tract infections. J AntimicrobChemother. 1992; 29(3):349-50.
7. Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, S., Fanning. Mechanisms of flouroquinolone resistance in Escherichia coli isolates from food-producing animals. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(20):7113-20.
8. Gagliotti, C., Buttazi, R., Sforza, S., Moro.M.L. Resistance to flouroquinolones and treatment failure/short –term relapse of community-acquaired urinary tract infections caused by Escherichia coli. J.Infect. 2008; 57(3):179-84.
9. Pereira AS, Andrade SS, Monteiro J, Sader HS, Pignatari ACC, Gales AC.. Evaluation of the Susceptibility Profiles, Genetic Similarity and Presence of qnr Gene in Escherichia coli Resistant to Ciprofloxacin Isolated in Brazilian Hospitals. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2007; 11(1):40-3.
10. Liu BT, Liao XP, Yang SS, Wang XM, Li LL, Sun J, Yang YR, Fang LX, Li L, Zhao DH and Liu YH. Detection of mutations in the gyrA and parC genes in Escherichia coli isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. Journal of Medical Microbiology. 2012; 61 :1591–9.
11. Saputri, W. Profil plasmid dan pola resistensi kuman Escherichia coli pada penderita ISK di RSUDAM Provinsi Lampung[tesis]. FMIPA Unila. 2015.
12. Samirah, Darwati, Windarwati, Hardjoeno. Pola dan sensitivitas kuman di penderita infeksi saluran kemih. Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory. 2006; 12(3):110-3.
13. Endriani, R., Andriani, F., Alfina, D. Pola resistensi bakteri penyebabinfeksi saluran kemih (ISK) terhadap antibiotik di Pekanbaru. Jurnal Natur Indonesia. 2010; 12(2):130-5.
14. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiol Spectr. 2014 ;2(2):2-6.
15. Wang, C.H., Fang, C.C., Chen, S.S., Liu, P.H., Yu, T.Y., Wu, W.T., Chen, C.C., dkk. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations. Archives of Internal Medicine. 2012; 172(13):988-96.
16. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, K., Bush., Hooper, D.C. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006; 12:83-8.
17. Kocsis, B. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae [disertasi]. Italia : Translational Biomedicine Doctorate School, Department of Pathology and Diagnostics, University of Verona ; 2012.
18. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiol Spectr. 2014 ;2(2):2-6.
19. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, and Hooper DC. oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents and Chemotherapy. 2009 ;53(8):3582-4.

20. Ciesielczuk H, Hornsey M, Choi V, Woodford N, and Wareham DW. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. *Journal of Medical Microbiology*. 2013 ;62:1823-7.
21. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, and Wang M. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012 ;67:1655-9.