

**POLIMORFISME *Escherichia coli* PENGHASIL  
EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLs)  
PADA PEMOTONGAN DENGAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI***

**SKRIPSI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**ANDHIKA TRISNA PUTRA**

**G.0006002**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET**

**Surakarta**

**2010**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

**Skripsi dengan judul : Polimorfisme *Escherichia coli* Penghasil  
*Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*  
pada Pemotongan dengan Enzim Restriksi *EcoRI***

Andhika Trisna Putra, NIM/Semester : G.0006002/VIII, Tahun : 2010

Telah diuji dan sudah disahkan di hadapan Dewan Penguji Skripsi  
Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta  
Pada Hari Kamis, Tanggal 25 Maret 2010

**Pembimbing Utama**

Nama : Mujosemedi, Drs., MSc.

NIP : 196005301989031001 .....

**Pembimbing Pendamping**

Nama : Betty Suryawati, dr., MBioMed Sci.

NIP : 197605252001122001 .....

**Penguji Utama**

Nama : Maryani, dr., MSi.

NIP : 196611201997022001 .....

**Anggota Penguji**

Nama : Rosalia Sri Hidayati, dr. MKes.

NIP : 194709271976102001 .....

Surakarta, April 2010

Ketua Tim Skripsi

Dekan FK UNS

**Sri Wahjono, dr., MKes.**

NIP : 194508241973101001

**Prof. Dr. A.A. Subijanto, dr., MS**

NIP : 194811071973101003

## PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 25 Maret 2010

Andhika Trisna Putra  
NIM G.0006002



## ABSTRAK

**Andhika Trisna Putra, G0006002, 2010,** Polimorfisme *Escherichia coli* Penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada Pemotongan dengan Enzim Restriksi *EcoRI*, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

*Escherichia coli* dilaporkan telah banyak resisten terhadap antibiotika golongan beta laktam terutama cephalosporin generasi ketiga, hal ini disebabkan akibat penggunaan antibiotika yang tidak rasional. Salah satu penyebab resistensi bakteri adalah akibat mutasi genom. Mutasi bakteri dapat diidentifikasi secara biomolekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada pemotongan dengan Enzim restriksi *EcoRI*.

Penelitian ini bersifat deskriptif observasional dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel diambil dari pasien yang dirawat di Poli Bedah, Bangsal Melati 3, Paviliun Cendana dan ruang perawatan intensif perinatal (PICU) RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Semua sampel diambil dari spesimen urin. Sampel yang teridentifikasi sebagai *Escherichia coli* penghasil ESBLs kemudian dilakukan ekstraksi DNA dan dilanjutkan dengan reaksi restriksi menggunakan enzim *EcoRI*. Hasil pemotongan kemudian dielektroforesis dengan gel agarosa 0,5% dan hasil akhir disajikan dalam bentuk foto.

Hasil elektroforesis menunjukkan gambaran pita DNA yang berbeda dari kelima sampel yang ada. Pada sampel pertama didapatkan satu buah pita DNA dengan panjang sekitar 1.750 bp. Sampel kedua didapatkan dua buah pita, pita pertama dengan panjang 3.000 bp sedangkan pita kedua dengan panjang 1.500 bp. Sampel ketiga didapatkan satu buah pita DNA dengan panjang sekitar 4.000 bp. Sampel keempat didapatkan tiga buah pita, pita pertama dengan panjang 2.000 bp, pita kedua dengan panjang sekitar 1.500 bp dan pita ketiga dengan panjang sekitar 1.400 bp. Sampel kelima yang merupakan kuman *Escherichia coli* standar didapatkan satu buah pita DNA yaitu dengan panjang sekitar 4.000 bp.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan adanya polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*.

---

**Kata Kunci :** polimorfisme, *Escherichia coli*, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*, enzim restriksi, *EcoRI*

## ABSTRACT

**Andhika Trisna Putra, G0006002, 2010**, Polymorphism of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in Digestion with EcoRI Restriction Enzyme, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta.

*Escherichia coli* was reported resistant to beta lactam antibiotic especially third generation cephalosporin, it was caused by irrational use of antibiotics. One the cause of bacterial resistance to antibiotics was a result of genome mutation. Bacterial mutations can be identified by biomolecular study. This study aims to elucidate polymorphism *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in the digestion with *EcoRI* restriction enzyme.

This is descriptive observational research with cross sectional approach. Samples were obtained from patient who was cared in polyclinic surgery, 3<sup>rd</sup> Melati ward, Cendana Pavilion and Perinatal Intensive Care Unit (PICU) installation room in Dr. Moewardi Hospital Surakarta. All samples were obtained from urine specimens. Samples were identified as *Escherichia coli* producing ESBLs were subjected to be DNA isolated and then followed by restriction reaction with *EcoRI* restriction enzyme. The result of the digestion was electrofored with agarose gel 0,5% and the final result was displayed in photos.

The electroforesis result shows different DNA bands of five samples. In the first sample showed a single DNA band with a length of approximately 1.750 bp. The second sample showed two bands, the first with a long ribbon 3.000 bp while the second band with 1.500 bp long. The third sample showed a single band of DNA with a length of approximately 4.000 bp. The fourth sample showed three bands, the first band with 2.000 bp long, the second with long ribbons of about 1.500 bp and the third band around 1.400 bp in length. The fifth sample, which is the standard *Escherichia coli* bacteria has one DNA band of approximately 4.000 bp in length.

The conclusion demonstrated polymorphism of *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in digestion with *EcoRI* restriction enzyme.

---

**Key words** : polymorphism, *Escherichia coli*, Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs), restriction enzyme, *EcoRI*

## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam karena berkat rahmat serta hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Polimorfisme *Escherichia coli* Penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada Pemotongan dengan Enzim Restriksi *EcoRI*”**. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak dapat terselesaikan tanpa bantuan dari berbagai pihak, maka dari itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. A.A. Subijanto, dr., MS., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Sri Wahjono, dr., M.Kes., selaku Ketua Tim Skripsi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
3. Mujosemedi, Drs., M.Sc selaku Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan motivasi bagi penulis.
4. Betty Suryawati, dr., M.BioMed Sci. selaku Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, nasehat, ilmu serta kesediannya untuk meluangkan waktu kepada penulis
5. Maryani, dr., M.Si. selaku Penguji Utama yang berkenan memberi saran, nasihat dan melengkapi kekurangan penulis dalam penyusunan skripsi ini.
6. Rosalia Sri Hidayati, dr. M.Kes. selaku Penguji Pendamping yang berkenan memberi saran, nasihat dan melengkapi kekurangan penulis dalam penyusunan skripsi ini.
7. Bagian skripsi Fakultas Kedokteran UNS, yang telah berkenan memberikan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
8. Segenap Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta
9. Serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan namanya satu persatu

Pada akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu kedokteran pada khususnya dan para pembaca pada umumnya. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini terdapat banyak kekurangan dan kelemahan, oleh sebab itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari para pembaca.

Surakarta, Maret 2010

Andhika Trisna Putra

**DAFTAR ISI**

KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
BAB II LANDASAN TEORI.....	5
A. Tinjauan Pustaka .....	5
1. Escherichia coli .....	5
2. Resistensi Bakteri Terhadap Antimikroba .....	6
3. <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamses (ESBLs)</i> .....	8
4. Identifikasi ESBLs .....	11
5. DNA .....	12
6. Mutasi .....	13
7. Deteksi DNA .....	14
a. Ekstraksi DNA .....	14
b. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i> .....	14

c. Enzim Restriksi .....	14
d. Gel Elektroforesis .....	15
B. Kerangka Pemikiran .....	17
BAB III METODE PENELITIAN .....	18
A. Jenis Penelitian .....	18
B. Lokasi Penelitian .....	18
C. Subjek Penelitian .....	18
D. Teknik Sampling .....	18
E. Variabel Penelitian .....	19
F. Definisi Operasional .....	19
G. Alur Penelitian .....	20
H. Alat dan Bahan .....	21
I. Cara Kerja .....	23
J. Teknik Penyajian Data .....	28
BAB IV HASIL PENELITIAN .....	29
A. Hasil uji skrining dan uji sensitivitas <i>Escherichia coli</i> penghasil <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)</i> .....	29
B. Hasil ekstraksi DNA <i>Escherichia coli</i> penghasil <i>Extended-</i> <i>Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)</i> .....	32
C. Hasil digesti <i>Escherichia coli</i> penghasil <i>Extended-Spectrum Beta-</i> <i>Lactamases (ESBLs)</i> menggunakan enzim restriksi <i>EcoRI</i> .....	34
BAB V PEMBAHASAN .....	36
BAB VI PENUTUP .....	41



A. Simpulan .....	41
B. Saran .....	41
DAFTAR PUSTAKA .....	42
LAMPIRAN	



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b> Distribusi sampel berdasarkan lokasi pengambilan sampel .....	30
<b>Tabel 2.</b> Hasil uji sensitivitas dengan metode Double Disc Synergy Test ....	31



**DAFTAR GAMBAR**

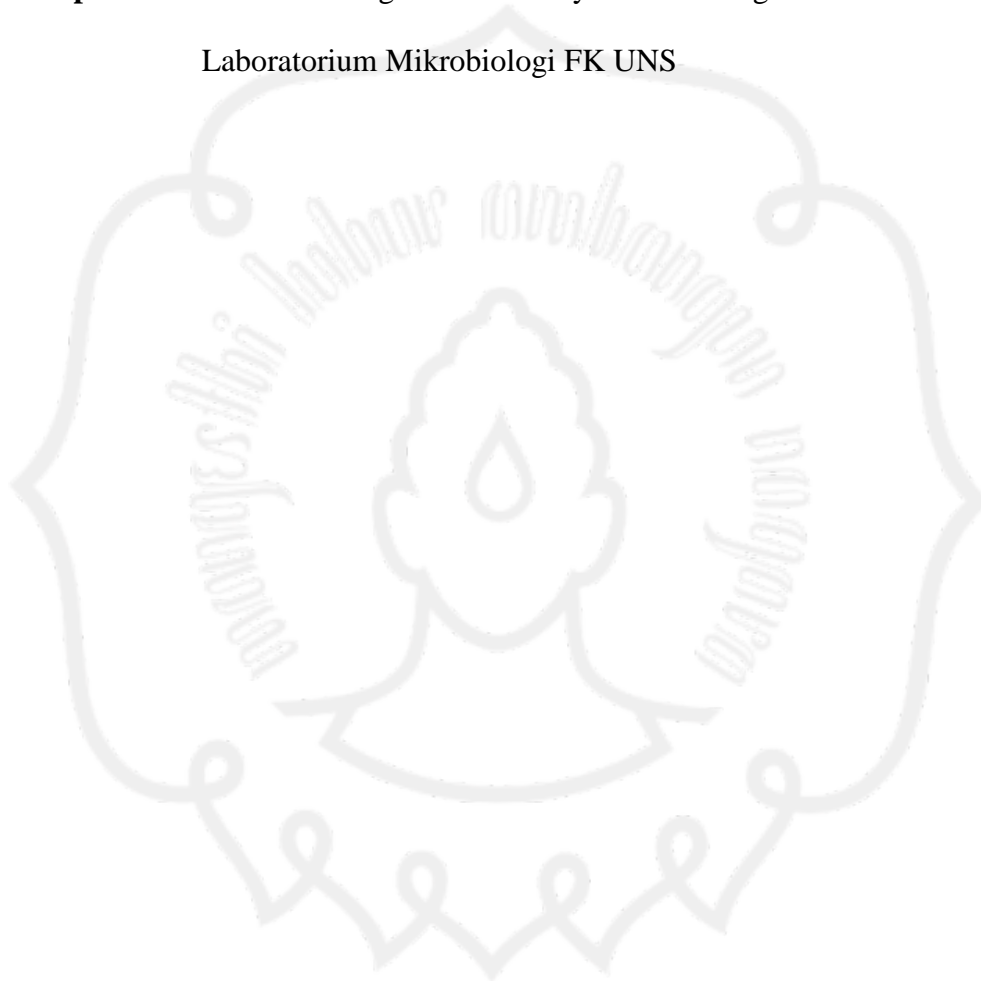
<b>Gambar 1.</b> Sampel 34 U .....	31
<b>Gambar 2.</b> Sampel 46 U .....	31
<b>Gambar 3.</b> Sampel 153 U .....	31
<b>Gambar 4.</b> Sampel 164 U .....	31
<b>Gambar 5.</b> Foto elektroforesis hasil ekstraksi DNA <i>Escherichia coli</i> .....	33
<b>Gambar 6.</b> Foto elektroforesis hasil pemotongan DNA <i>Escherichia coli</i> dengan enzim restriksi EcoRI .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Surat Ijin Penelitian dan Pengambilan Sampel

**Lampiran 2.** Surat Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*)

**Lampiran 3.** Surat Keterangan Telah Menyelesaikan Kegiatan Penelitian Di  
Laboratorium Mikrobiologi FK UNS



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. LATAR BELAKANG**

*Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri golongan enterobakter yang sering menyebabkan infeksi pada saluran kemih. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) berperan atas 90% kasus infeksi saluran kemih pada wanita muda (Jawetz *et al.*, 2005). Selain infeksi saluran kemih, *Escherichia coli* juga menjadi penyebab terjadinya kasus sepsis neonatorum, meningitis pada bayi serta diare. Berdasarkan sifat virulensinya, *Escherichia coli* penyebab diare terdiri dari Enteropatogenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), Enterohemoragik *E. coli* (EHEC), Enteroinvasif *E. coli* (EIEC) dan Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) (Velasco *et al.*, 2006).

Resistensi bakteri terhadap antibiotika merupakan masalah yang serius dalam dunia kesehatan. Penggunaan antibiotika secara irrasional merupakan salah satu penyebab suatu antibiotik kehilangan kemampuannya dalam melawan bakteri (Paterson dan Bonomo, 2005). Setengah abad yang lalu era antibiotika diawali dengan penemuan penicillin oleh Alexander Flemming. Beberapa tahun setelah penggunaan penicillin sebagai antimikroba dalam klinik, enzim penicillinase yang dihasilkan kuman *Staphylococcus aureus* ditemukan. Untuk mengatasi hal tersebut, antibiotika golongan penicillin yang resisten terhadap enzim penicillinase mulai dikembangkan. Tidak lama setelah

itu, penicillin spektrum luas serta cephalosporin generasi pertama mulai diperkenalkan. Penicillin spektrum luas merupakan obat lini pertama terhadap bakteri selama lebih dari dua puluh tahun sebelum resistensi terhadap enzim  $\beta$ -laktamase yang diproduksi oleh bakteri batang gram negatif menjadi masalah yang serius (Medeiros, 1997). Resistensi bakteri terhadap antibiotika umumnya terjadi akibat perilaku persepsian antibiotika dan perilaku petugas kesehatan yang masih jauh dari rasional. Faktor risiko yang paling sering ditemukan adalah penggunaan antibiotika tanpa indikasi yang jelas serta tidak menerapkan konsep-konsep aseptik saat menangani pasien. Yang cukup memprihatinkan, resistensi terhadap bakteri di unit perawatan intensif (ICU) relatif lebih tinggi daripada di bangsal perawatan (Dwiprahasto, 2005).

Peningkatan jumlah kematian dan kesakitan seringkali berhubungan dengan infeksi kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs), terutama bagi pasien yang dirawat di unit perawatan intensif. Deteksi laboratorium yang akurat sangat penting dilakukan untuk mencegah terapi antimikroba yang tidak tepat bagi pasien (Andrews, 2004). Cephalosporin generasi ketiga adalah antibiotik empiris yang sering diberikan di RSUD Dr. Moewardi Surakarta terutama di unit perawatan intensif. Antibiotika tersebut digunakan pada pencegahan dan terapi kasus-kasus berat pada pasien yang dirawat di unit perawatan intensif (Primaningtyas, 2008).

Setelah diketahui bahwa sebagian besar ESBLs diperantarai oleh plasmid, analisis molekuler mengenai kuman penghasil ESBLs mulai digunakan sebagai penelitian epidemiologi. Identifikasi tipe genom

merupakan hal yang penting dalam analisis epidemiologi terhadap infeksi nosokomial akibat bakteri batang gram negative penghasil ESBLs (Osamu *et al.*, 2004). Metode sederhana yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah serta ukuran genom yang dibawa oleh mikroorganisme ialah dengan cara elektroforesis menggunakan gel agarose (Paterson dan Bonomo, 2005). Analisis diawali dengan tahap digesti menggunakan enzim restriksi kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarose (Studier, 2000). Enzim restriksi yang sering digunakan dalam penelitian molekuler adalah *EcoRI*. *EcoRI* ialah enzim endonuklease restriksi yang diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* dan memotong pada sekuen GAATTC. Kemudian gambaran potongan pita DNA dapat diamati di bawah sinar ultraviolet (Bitinaite *et al.*, 1998). Dengan melihat gambaran potongan panjang fragmen DNA maka dapat dideteksi polimorfisme strain suatu mikroorganisme (Kurpiewski *et al.*, 2004).

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian tentang polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*. Sampel kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* didapat dari RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

## **B. RUMUSAN MASALAH**

Berdasarkan latar belakang maka dapat dirumuskan masalah penelitian, yaitu bagaimana polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*?

### C. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*.

### D. MANFAAT PENELITIAN

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi langkah awal untuk penelitian lebih lanjut sebagai upaya untuk mengetahui strain-strain kuman penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*
2. Di samping itu, penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai titik awal dari studi epidemiologi yang dapat digunakan untuk mengontrol dan mengatasi wabah akibat infeksi kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* yang resisten terhadap antibiotika golongan beta laktam spectrum luas terutama cephalosporin generasi ketiga.



## BAB II

### LANDASAN TEORI

#### A. TINJAUAN PUSTAKA

##### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang termasuk dalam golongan enterobacteriaceae. Kuman ini merupakan kuman komensal pada usus besar manusia (Todar, 2008). Virulensi strain *Escherichia coli* dapat menjadi penyebab gastroenteritis, infeksi saluran kemih dan meningitis neonatorum. Pada kasus yang jarang dapat menyebabkan *Hemolytic Uremic Syndrome*, peritonitis, mastitis, septikemia dan pneumonia gram negatif (Madappa, 2009).

*Escherichia coli* memiliki sifat anaerob fakultatif, dapat tumbuh secara optimal pada suhu 37°C dan tidak menghasilkan spora. Kuman ini berbentuk batang dengan panjang 2 µm serta diameter 0,5 µm dengan volume sel 0,6-0,7 µm<sup>3</sup> (Wikipedia, 2009). *Escherichia coli* memiliki kemampuan untuk melakukan transfer DNA melalui proses konjugasi, transduksi ataupun transformasi materi genetik dengan menyebar secara horizontal pada populasi yang sesuai (Brussow *et al.*, 2004).

Terdapat beberapa tipe virulensi dari *Escherichia coli*, yaitu *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) menyebabkan diare (tanpa demam) pada manusia, babi, domba dan kuda. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) sebagai

agen penyebab diare pada manusia, kelinci, anjing, kucing dan kuda. *Enteroinvasive E. coli* (EIEC) yang hanya ditemukan pada manusia. *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) ditemukan pada manusia dan kambing serta *Enteroaggregative E. coli* (EAEC) yang hanya ditemukan pada manusia (Todar, 2008).

*Escherichia coli* yang diisolasi dari spesimen feses, urin, sputum, cairan serebrospinal, maupun darah dapat dikultur dengan menggunakan media agar Mac Conkey maupun agar EMB (Paton dan Paton, 1998). Agar EMB yang mengandung satu jenis gula dalam konsentrasi tinggi akan menyebabkan organisme memfermentasi gula sehingga membentuk koloni berwarna kemerahan (Brooks *et al.*, 2008).

*Escherichia coli* sering menunjukkan berbagai resistensi terhadap antibiotika, dengan mekanisme mutasi dan pembentukan gen resisten ekstrakromosom melalui pertukaran plasmid (Salyers *et al.*, 2004).

## **2. Resistensi Bakteri Terhadap Antimikroba**

Resistensi bakteri terhadap antimikroba terjadi melalui banyak mekanisme dan cenderung semakin rumit pendeteksiannya. Berbagai mekanisme genetik ikut terlibat, termasuk di antaranya mutasi kromosom, ekspresi gen-gen resisten kromosom laten, didaptnya resistensi genetik baru melalui pertukaran langsung DNA, bakteriofag, plasmid DNA ekstrakromosom, ataupun didaptnya DNA melalui mekanisme transformasi (Dwiprahasto, 2005).

Bakteri dapat resisten terhadap antibiotika melalui perubahan pada struktur genom. Resistensi didapat karena 2 proses genetik dari bakteri : 1) mutasi dan seleksi (disebut juga evolusi vertikal); 2) perubahan genetik antara beberapa strain dan spesies (disebut juga evolusi horizontal) (Todar, 2008).

Resistensi bakteri terhadap antibiotika dapat diperantarai plasmid. Plasmid merupakan elemen dari asam nukleotida sirkuler yang secara otonomi dapat bereplikasi sendiri di dalam sel inangnya. Plasmid juga disebut sebagai minikromosom karena kemampuannya untuk bereplikasi sendiri dan sama sekali tidak berhubungan dengan sifat kromosom utamanya. Plasmid mempunyai kemampuan membawa materi genetik terhadap sifat-sifat resistensi terhadap antibiotika tertentu. Karena terletak pada plasmid maka gen resisten terhadap antibiotik mampu dikopi dengan jumlah yang sangat banyak tanpa mampu dikendalikan oleh kromosom utamanya (Tortora *et al.*, 2007).

Terdapat tiga jenis plasmid bakteri yang telah berhasil diteliti, yaitu: 1) F dan F' plasmid yang merupakan faktor fertilitas dalam proses konjugasi, 2) R plasmid, (dahulu disebut RTF plasmid) yaitu *resistance transfer factors* yang berperan dalam resistensi terhadap antibiotika, serta 3) Col plasmid, (dahulu disebut *colicinogenic factors*) yaitu plasmid yang mengkode colicins, protein yang dapat membunuh sel sensitif *E. Coli*. Sekarang col plasmid lebih dikenal sebagai *bacteriocins* (Gardner dan Snustad, 2002).

Proses pertukaran genetik pada bakteri dapat terjadi melalui proses transformasi, transduksi dan konjugasi. Proses konjugasi ditemukan oleh J. Lederberg dan E.L. Tatum pada tahun 1946. DNA ditransfer dari sebuah sel pendonor ke sel penerima melalui hubungan interseluler khusus atau pipa konjugasi yang terbentuk diantara kedua sel tersebut. Selama konjugasi, proses transfer informasi genetik terjadi secara satu arah. Sel pendonor dibedakan dengan sel penerima karena memiliki pili F di permukaan selnya. Pembentukan pili F ini dikendalikan oleh beberapa gen yang dibawa oleh minikromosom disebut sebagai faktor F yang merupakan faktor fertilitas. Faktor F dapat juga disebut sebagai *sex factor* maupun F plasmid. Sel pendonor yang memiliki faktor F disebut sel F<sup>+</sup> sedangkan yang tidak memiliki faktor F disebut F<sup>-</sup>. Faktor F ditransfer dari sel F<sup>+</sup> kepada sel F<sup>-</sup> ketika kedua sel tersebut berkonjugasi. Kemudian sel ini disebut sel Hfr (*High frequency recombination*) yang membawa hasil penggabungan faktor F (Gardner dan Snustad, 2002).

Faktor penting yang berperan dalam peningkatan resistensi bakteri terhadap antimikroba yaitu kemampuan organisme untuk mentransfer, memperoleh dan merekayasa gen resisten, serta penekanan selektif bakteri akibat penggunaan antibiotika spektrum luas (*broad spectrum*) secara berlebihan (Jawetz *et al.*, 2005). Efek kombinasi dari pertumbuhan bakteri yang cepat, proses genetik berupa mutasi dan seleksi, serta kemampuan merubah gen, menyebabkan angka kejadian resistensi bakteri terhadap antibiotik terjadi sangat cepat dan luas (Todaro, 2008)

### 3. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*

*Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* dapat dibagi menjadi empat kelas berdasarkan struktur asam aminonya. Keempat kelas tersebut ialah kelas A sampai dengan kelas D. ESBLs kelas A, C, dan D mempunyai gugus asam amino serin, sedangkan ESBLs kelas B merupakan metallo- $\beta$ -laktamase (Bush *et al.*, 1995).

ESBLs dapat ditemukan pada bakteri golongan enterobakter. Strain ESBL terutama diproduksi oleh spesies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* dan *Escherichia coli*. Organisme lain dilaporkan juga dapat menghasilkan enzim ESBL termasuk *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Namun frekuensi produksi ESBL dari organisme tersebut tergolong rendah (Nathisuwan *et al.*, 2001).

ESBLs meliputi *TEM-type ESBLs*, terdiri dari TEM-10, TEM-12, dan TEM-26. Istilah TEM berasal dari kata *Temoneira* yang merupakan nama pasien pertama yang terinfeksi kuman penghasil ESBL. *SHV-type ESBLs*, terdiri dari SHV-5 dan SHV-12. Pemberian nama SHV berdasarkan *sulphydryl variabel*. Tipe SHV merupakan kelompok enzim yang paling banyak. *CTX-M type ESBLs*, terdiri dari CTX-M-2, CTX-M-3 dan CTX-M-14. Enzim ini dinamakan demikian karena kemampuannya melawan aktivitas cefotaxime. *OXA-type ESBLs* digolongkan karena kemampuannya menghidrolisis oxacilin. (Medeiros dan Crellin, 1997).

Enzim ESBLs klas A banyak ditemukan pada isolat kuman *Pseudomonas aeruginosa*. ESBLs klas B merupakan enzim metallo- $\beta$ -laktamase. ESBLs klas C sering disebut *plasmid-mediated AmpC enzymes*. Enzim ini merupakan penyebab terjadinya resistensi *Enterobacter cloacae* terhadap cephalosporin spektrum luas. Resistensi terhadap antibiotik ini diperantarai plasmid, selanjutnya plasmid dapat ditransfer kepada *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, dan *Escherichia coli*. Setelah itu kuman-kuman tersebut mempunyai resistensi yang sama kuatnya dengan *Enterobacter cloacae* terhadap cephalosporin spektrum luas. Asam klavulanat yang merupakan suatu inhibitor dapat menghambat resistensi yang dilakukan enzim *AmpC beta lactamase*. ESBLs klas D atau *OXA-type ESBLs* banyak ditemukan terdapat pada *Pseudomonas aeruginosa* dan relatif resisten terhadap daya hambat asam klavulanat (Jacoby *et al.*, 2007).

Kuman penghasil enzim ESBLs memiliki kemampuan resistensi terhadap antibiotika dengan cara menghidrolisis antimikroba jenis penicillin, cephalosporin generasi pertama, kedua dan ketiga, serta golongan aztreonam. Namun, kuman penghasil enzim ESBLs ini masih sensitif terhadap antibiotika cephamicin dan carbapenem (Bush *et al.*, 1995).

Penggunaan cephalosporin generasi ketiga dan aztreonam secara luas diyakini sebagai penyebab utama timbulnya resistensi terhadap antibiotika golongan  $\beta$ -laktam spektrum luas. Enzim ini resisten terhadap

antibiotik cefotaxim, ceftazidim serta golongan monobaktam seperti aztreonam. Namun resistensi *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* tidak tampak terhadap cephamicin dan imipenam yang merupakan cephalosporin generasi berikutnya (Chaudhary dan Aggarwal, 2004).

#### 4. Identifikasi ESBLs

Metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi kuman penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* menurut *Clinical Laboratory Standard Institute* ialah *Double Disk Synergy Test (DDST)* yang menggunakan kombinasi cephalosporin dan asam klavulanat. Identifikasi ini menggunakan media Mueller-Hinton agar. Sinergi cephalosporin generasi III dengan kombinasi cephalosporin-asam klavulanat berupa perluasan zona hambatan atau timbulnya halo diantara kedua disk menunjukkan kuman tersebut positif ESBLs (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

Metode lain untuk mengidentifikasi kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* ialah dengan menggunakan metode *Double Diffusion Test (DDT)*. Metode ini menggunakan cefotaxim (30 µg) serta ceftazidim (30 µg) dengan atau tanpa klavulanat (30 µg) untuk menentukan konfirmasi fenotip dalam mengidentifikasi kuman penghasil enzim ESBLs. Dengan menggunakan media Mueller-Hinton agar apabila terjadi perbedaan sebesar  $\geq 5$  mm antara diameter disk cephalosporin dan disk kombinasi cephalosporin-klavulanat menyatakan kuman tersebut

positif ESBLs (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

Analisis makrorestriksi terhadap DNA kromosom kuman penghasil ESBLs dapat dilakukan dengan menggunakan *Pulsed-Field Gel Electroforesis (PFGE)* kemudian diwarnai dengan ethidium bromida setelah itu difoto di bawah sinar ultraviolet (Pena *et al.*, 1998).

## 5. DNA (Deoxyribonucleic Acid)

DNA adalah suatu molekul yang tersusun oleh nukleotida yang terdiri atas gugus fosfat, gula deoksiribosa, dan basa nitrogen. Empat basa yang biasa ditemukan pada DNA adalah Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C), Timin (T). Adenin dan Guanin mempunyai struktur kimia yang berbentuk dua cincin. Struktur dua cincin ini disebut Purin. Sedangkan Sitosin dan Timin mempunyai struktur kimia yang berbentuk cincin tunggal. Struktur cincin tunggal ini disebut Pirimidin. Dua polinukleotida dihubungkan oleh ikatan hidrogen berdasarkan struktur mereka. Adenin dan Timin mempunyai dua ikatan hidrogen, sedangkan Guanin dan Sitosin mempunyai tiga ikatan hidrogen. Jadi Adenin akan selalu berpasangan dengan Timin sedangkan Guanin akan selalu berpasangan dengan Sitosin (Snustad, 2000).

Kebanyakan gen-gen prokariot dibawa oleh kromosom bakteri. Data sekuen genom menunjukkan bahwa sebagian besar genom prokariot terdiri dari satu molekul DNA sirkular yang mengandung DNA mulai dari 580 kbp sampai lebih dari 4600 kbp. Gen-gen yang penting untuk



pertumbuhan bakteri dibawa oleh kromosom, dan plasmid membawa gen-gen yang berhubungan dengan fungsi khusus. Banyak plasmid membawa gen yang memperantarai transfer genetik dari satu organisme ke organisme lain serta gen-gen lain yang berhubungan dengan akuisisi atau penyusunan DNA kembali. Akibat dari peristiwa genetik ini dapat diamati pada penyebaran cepat sifat resistensi (yang dibawa plasmid) populasi bakteri terhadap antibiotik, setelah antibiotik digunakan secara bebas di rumah sakit (Brooks *et al.*, 2008).

## 6. Mutasi

Mutagen kimia yang utama adalah (1) analog basa, yaitu basa purin dan pirimidin yang mirip dengan basa standar pada nukleotida saat disintesis oleh sel. Hasil nukleotida yang tidak biasa ini kemudian dapat digunakan sebagai substrat pada sintesis DNA saat replikasi genom. (2) *deaminating agents*, menimbulkan *point mutation*. (3) *alkylating agents*, menimbulkan mutasi titik, dan (4) *intercalating agents* selalu berkaitan dengan mutasi insersi (Brown, 2002).

Mutasi mempunyai efek langsung terhadap fungsi genom, dan efek tidak langsung pada sifat fenotip mikroorganisme. Efek langsung dapat dengan mudah diketahui karena fungsi genom dapat diketahui berdasarkan struktur gen dan ekspresi gen. Efek tidak langsung bersifat lebih kompleks karena berkaitan dengan sifat fenotip organisme yang mengalami mutasi (Brown, 2002).

## 7. Deteksi DNA

### a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan prosedur rutin dalam isolasi DNA, untuk penelitian tingkat molekuler, atau analisis forensik. Tahapan ekstraksi DNA adalah (1) Melisiskan sel bakteri, dengan *cell lysis solution*. (2) Mempresipitasi protein, dengan *protein precipitation solution*. (3) Rehidrasi DNA, dengan *DNA rehydration solution*. (4) Menghilangkan RNA, dengan *RNAse solution* (Promega, 2005).

### b. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* dikenal luas oleh para ilmuwan biologi dalam menentukan suatu polimorfisme. Jika dua organisme berbeda dalam hal jarak antara sisi potongan DNA menggunakan enzim restriksi tertentu, maka panjang fragmen yang dihasilkan akan berbeda saat DNA tersebut dipotong dengan enzim restriksi (Sambrook dan Russell, 2001). Prinsip utama teknik ini adalah menggunakan enzim endonuklease restriksi yang cocok pada sisi pemotongan spesifik, jika molekul berbeda pada sekuen nukleotidanya, maka akan dihasilkan fragmen DNA yang berbeda ukuran. Beberapa enzim restriksi yang sering digunakan adalah *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* dan lain-lain (Hill, 2000).

### c. Enzim restriksi

Enzim restriksi memotong DNA dengan dua cara yang berbeda. Salah satunya membuat pemotongan pita ganda sederhana, yang

memberikan bentuk potongan tumpul (*blunt/flush end*), sedangkan yang lain memotong pita-ganda DNA pada posisi yang berbeda, sehingga menghasilkan potongan ujung lancip (*cohesive/sticky end*).

### ***EcoRI***

*EcoRI* adalah enzim endonuklease restriksi yang paling banyak digunakan dalam penelitian terkini. Enzim ini diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* dan memotong pada sekuen GAATTC. Sekuen GAATTC muncul tiga kali dalam rantai DNA, maka dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* akan menghasilkan 3 fragmen DNA (Biology Science, 2005).

Enzim ini didapat dari bakteri *Escherichia coli* RY 13. Lokasi pemotongan:

5' - G<sup>^</sup>AATT C-3'

3' - C TTAA<sup>^</sup>G-5'

Sifat pemotongan : ujung lancip (*cohesive/sticky end*)

Inkubasi : buffer, 37°C

Penyimpanan : disimpan pada suhu -20°C

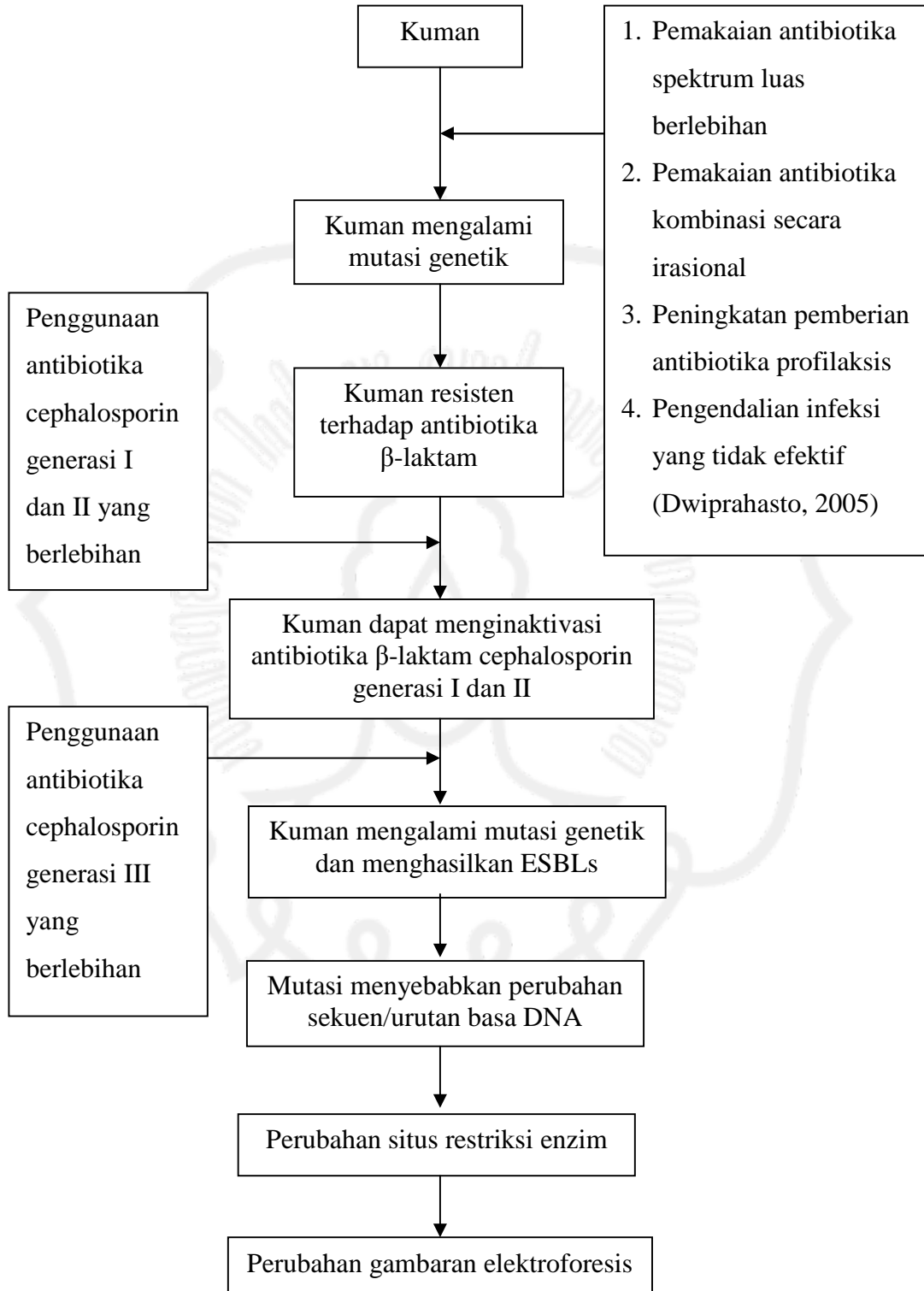
(Promega, 2005)

#### **d. Gel Elektroforesis**

Gel elektroforesis merupakan metode analisis kualitatif untuk menganalisis DNA. Agarosa merupakan polisakarida yang berasal dari rumput laut dan akan membentuk gel padat jika diarutkan dengan pemanasan pada konsentrasi antara 0.5 dan 2% (w/v). Agarosa yang

digunakan untuk elektroforesis lebih murni bila dibandingkan dengan agar yang digunakan dalam kultur bakteri. Agarosa akan membentuk pori yang besarnya sesuai dengan konsentrasi agarose. Molekul DNA yang lebih pendek akan bergerak lebih cepat didalam gel agarose sebaliknya molekul yang lebih panjang akan bergerak lebih lambat.

Pada penelitian digunakan TBE 30 mL dicampur dengan 0,1 g bubuk agarosa dan dipanaskan di dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih. TBE digunakan karena larutan ini memungkinkan DNA bergerak dengan perlahan di dalam gel. Larutan ini akan mengoptimisasi pH dan konsentrasi ion di dalam gel sekaligus merendam gel sehingga arus listrik dapat mengalir dalam gel. TBE mengandung *Tris* yang merupakan senyawa kimia yang membantu mempertahankan konsistensi pH dalam larutan. Selain itu juga mengandung *boric acid* yang berfungsi untuk menyediakan konsentrasi ion yang tepat untuk buffer dan EDTA yang berfungsi mengkelat (*chelating*) kation divalent magnesium (University Of Arizona, 2002).

**B. KERANGKA PEMIKIRAN**

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. JENIS PENELITIAN**

Penelitian ini bersifat deskriptif observasional dengan pendekatan *cross sectional*.

#### **B. LOKASI PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Dr. Moewardi Surakarta, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

#### **C. SUBJEK PENELITIAN**

1. Populasi : Kuman *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*
2. Sampel : Kuman *Escherichia coli* penghasil *Extended - Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* yang didapat dari RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

#### **D. TEKNIK SAMPLING**

Dalam penelitian ini pengambilan data dilakukan dengan teknik *Quota sampling*. Tidak berdasarkan atas perhitungan besar sampel yang representatif. Semua dari anggota sampel harus memenuhi kriteria tertentu yang telah ditetapkan dan paling mudah untuk dijumpai (Taufiqurrahman, 2004).

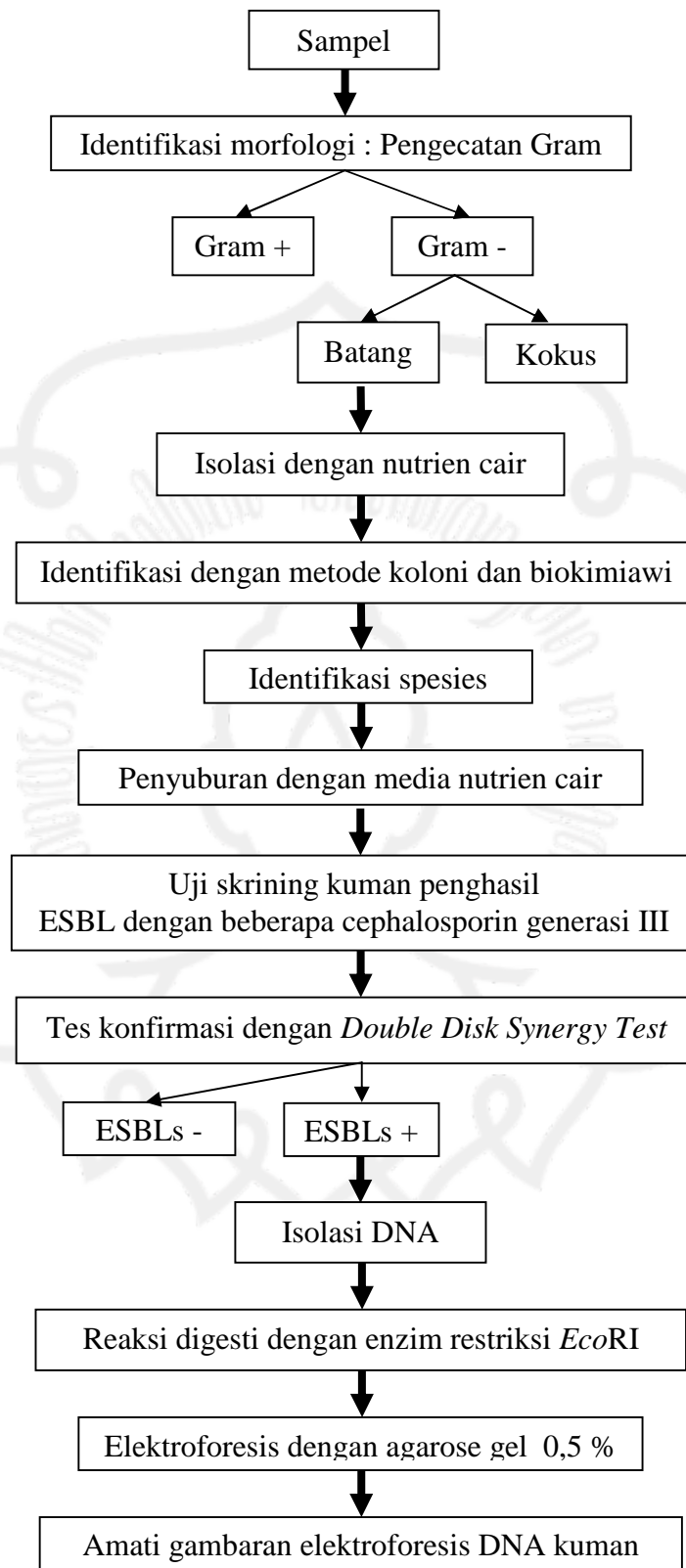
Spesimen yang digunakan diambil dari isolat feses, urine, sputum, pus, cairan aspirasi maupun muntahan yang didapat dari pasien.

#### **E. VARIABEL PENELITIAN**

Polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*.

#### **F. DEFINISI OPERASIONAL**

1. Polimorfisme dalam ilmu biologi molekuler adalah perbedaan bentuk dari sekuen DNA yang dapat dideteksi berdasarkan panjang fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan dengan enzim endonuklease restriksi, dalam hal ini enzim *EcoRI*, dan divisualisasi dengan elektroforesis gel.
2. *Escherichia coli* yang digunakan sebagai sampel adalah *Escherichia coli* yang didapat dari pasien RSUD Dr. Moewardi Surakarta, dengan rincian pasien yang dirawat di poli bedah, pasien yang dirawat di Bangsal Melati 3, pasien yang dirawat di Paviliun Cendana dan pasien yang dirawat di ruang instalasi PICU RSUD Dr. Moewardi Surakarta.
3. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL)* adalah enzim yang dihasilkan bakteri golongan enterobakter yang memiliki kemampuan menghidrolisis antimikroba jenis penicillin, cephalosporin generasi I, II, III serta golongan aztreonam. Identifikasi ESBLs dengan *Double Disk Synergy Test* menggunakan kombinasi cephalosporin dan asam klavulanat. Sinergi berupa perluasan zona hambatan antara disk cephalosporin generasi III dengan disk kombinasi cephalosporin-asam klavulanat menunjukkan kuman tersebut positif ESBLs (NCCLS, 2005).

**G. ALUR PENELITIAN**



## H. ALAT DAN BAHAN

### 1. Alat Penelitian

- a. Cawan petri sedang (diameter 10cm)
- b. Tabung perbenihan
- c. Mikroskop binokuler
- d. *Object glass*
- e. *Deck glass*
- f. Inkubator
- g. Oshe kolong
- h. Kapas lidi steril
- i. Tabung mikrosentrifuge 0,6 ml dan 1,5 ml (Axygen)
- j. Mikrosentrifuge (Heittich)
- k. Gelas ukur
- l. Tabung Erlenmeyer
- m. *Shaker* inkubator
- n. Mikropipet ukuran 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- o. Tips pipet ukuran 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- p. Satu set alat elektroforesis horizontal (Bio Rad)
- q. *UV Transluminator*

### 2. Bahan Penelitian

- a. Kultur dan identifikasi kuman penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*
  - 1) Media Mac Conkey Agar

- 2) Media Muller Hinton Agar
  - 3) Media identifikasi (KIA, SIM, Urea, Simon Citrat)
  - 4) Media kaldu pepton cair
  - 5) Media nutrient agar miring
  - 6) Cat Gram
  - 7) Disk antibiotik (cefotaxim, ceftazidim, amoxicillin-asam klavulanat)
- b. Isolasi DNA kuman penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*
- 1) Genomic DNA Purification Kit, yang terdiri atas: *Cell Lysis Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Rehydration Solution, RNase Solution.*
  - 2) Isopropanol
  - 3) Etanol 70%
  - 4) Water bath, 80<sup>0</sup>C, 37<sup>0</sup>C, 65<sup>0</sup>C
  - 5) 50nM EDTA (PH 8.0)
  - 6) *Lysozyme* 10 mg/ml
  - 7) *Proteinase K* 10 mg/ml
  - 8) *Binding Buffer*
- c. Pemotongan DNA kuman penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta- Lactamases*
- 1) *EcoR1* dan buffernya
  - 2) *Nuclease free water*

d. Elektroforesis

- 1) *Agarose gel*
- 2) *Aquadestilat*
- 3) *Ethidium bromide*
- 4) *Tris Boric EDTA (TBE) 0,5×*
- 5) *Lambda DNA markers 0.1–12 kbp Novagen*
- 6) *Gel loading buffer*
- 7) Kertas parafilm

**I. CARA KERJA**

1. Pengambilan sampel
  - a. Sampel dikhususkan pada kuman-kuman enterik, diambil dari spesimen urin.
  - b. Sampel diisolasikan ke dalam media kaldu pepton cair dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
2. Identifikasi kuman
  - a. Kuman pada media kaldu pepton cair diambil dengan oshe kolong yang sebelumnya telah dipanaskan.
  - b. Kuman pada oshe kolong tersebut diratakan pada objek glass dan kemudian dilakukan pengecatan gram.
  - c. Hasil positif jika ditemukan kuman gram negatif berbentuk batang.
3. Penanaman pada media Mac Conkey agar
  - a. Diambil satu oshe kolong koloni bakteri yang sama pada pengecatan gram dari nutrient agar plate kemudian digoreskan

- pada media Mac Conkey.
- b. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
  - c. Melakukan identifikasi pada masing-masing koloni yang berbeda.
4. Pemiakan pada media deret identifikasi
- a. Mengambil salah satu koloni dari media tersebut untuk ditanam pada media deret identifikasi.
  - b. Pengambilan koloni bakteri pada media Mac Conkey (setelah dilakukan pengecatan gram) menggunakan oshe jarum yang sebelumnya sudah dipanaskan.
  - c. Menusukkan oshe jarum tersebut pada media deret identifikasi (KIA, SIM, Urea, Simon Sitrato).
  - d. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
  - e. Pertumbuhan kuman pada media deret identifikasi diamati dan dicocokkan dengan tabel untuk mengidentifikasi kuman.
5. Pemeriksaan bakteri penghasil ESBLs dengan Metode DDM (*Double Disk Methode*)
- a. Bakteri yang teridentifikasi sebagai *Escherichia coli* selanjutnya disuburkan pada media kaldu pepton cair.
  - b. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
  - c. Letakan disk cefotaxime, amoxicillin dengan asam klavulanat, dan ceftazidime pada garis tengah media Muller-Hinton agar yang telah ditumbuhi koloni kuman dengan jarak masing-masing 25 mm (amoxicillin dengan asam klavulanat di antara cefotaxime dan

ceftazidime)

- d. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
  - e. Sinergi berupa perluasan zona hambatan antara disk cephalosporin generasi III dengan disk kombinasi cephalosporin-asam klavulanat menunjukkan kuman tersebut positif ESBL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).
6. Isolasi DNA bakteri penghasil ESBLs
- a. Ambil 1-2 koloni dari media agar, kemudian masukkan ke dalam 4 mL kaldu pepton, kemudian inkubasi selama semalam pada suhu 37°C atau sampai OD<sub>600</sub> nya minimal 1 unit atau setara dengan  $0,8 \times 10^9$  sel/mL.
  - b. Masukkan 1,5 mL kultur bakteri ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 mL.
  - c. Sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang.
  - d. Tambahkan 200 µl PBS ke dalam tabung microsentrifuge yang berisi sel bakteri.
  - e. Tambahkan *lysozyme* 10 mg/ml sebanyak 2,5 µl. Prosedur ini digunakan untuk melarutkan dinding sel, sehingga proses lisis sel dapat berlangsung efisien.
  - f. Inkubasi sampel 37°C selama 15 menit.
  - g. Tambahkan ke dalam sampel 200 µL *Binding Buffer* dan 10 µL *Proteinase K*.

- h. Inkubasi sampel 70°C selama 10 menit
  - i. Tambahkan isopropanol 100 µL, campur dengan baik
  - j. Masukkan satu *High Pure Filter Tubes* ke dalam *collection tube*.  
Kemudian tuang sampel ke dalam *buffer reservoir* dari *filter tube*.  
Sentrifuge pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian buang supernatan
  - k. Tambahkan 500 µL *Inhibitor Removal Buffer*. Sentrifuge pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian buang supernatan.
  - l. Tambahkan 500 µL *Wash Buffer*. Sentrifuge pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian buang supernatan.
  - m. Tambahkan 500 µL *Wash Buffer* satu kali lagi. Sentrifuge pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian buang supernatan
  - n. Sentrifuge 13.000 rpm selama 10 detik. Buang *collection tube*.
  - o. Masukkan *filter tube* ke dalam tabung microsentrifuge 1,5 mL, lalu tambahkan 200 µL *elution buffer* (yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 70°C)
  - p. Sentrifuge 8.000 rpm selama 2 menit
  - q. DNA yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai penggunaan berikutnya
7. Pemotongan DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases ESBLs* (Reaksi Digesti)
- a. Ke dalam tabung mikrosentrifuge 0,6mL yang diletakkan di atas es dimasukkan 2 µL *buffer*, 11 µL *Nuclease free water*, 5 µL DNA

sampel, kemudian baru dimasukkan 0,5  $\mu$ L enzim restriksi *EcoR*1.

- b. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1-2 menit.
- c. Inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 6 jam.
- d. Larutan ini siap untuk dielektroforesis.

#### 8. Elektroforesis

- a. Larutkan 0,1 gram *agarose* ke dalam 10 mL *aquabidest*, kemudian masukkan ke dalam *microwave oven*. Kemudian tuangkan ke dalam *Glass plate*, dengan sisir terpasang pada posisi tegak.
- b. Biarkan gel mengeras pada suhu kamar, kemudian ambil sisir dengan hati-hati.
- c. Masukkan gel yang telah mengeras ke dalam larutan yang mengandung *Tris boric EDTA* 0,5x.
- d. Ambil 1  $\mu$ L *gel loading buffer*, 1  $\mu$ L *etidium bromide*, 5  $\mu$ L DNA sampel *Escherichia coli*. Letakkan masing-masing ke dalam kertas parafilm, campur. Kemudian ambil lagi dan masukkan ke dalam *well* elektroforesis.
- e. Kemudian ambil 3  $\mu$ L *gel loading buffer*, 2  $\mu$ L *etidium bromide*, 1  $\mu$ L *lambda DNA marker*. Letakkan masing-masing di atas kertas parafilm, campur. Kemudian masukkan ke dalam *well* elektroforesis.
- f. Hubungkan elektroda dengan *power supply*, kemudian lakukan elektroforesis dengan tegangan 110V dan arus 500mA selama 1-2 jam.

- g. Amati pita yang terbentuk di bawah sinar ultraviolet.
- h. Untuk keperluan dokumentasi gel difoto dengan *Gell Doc* kemudian dicetak dengan *Video Printing*.

#### **J. TEKNIK PENYAJIAN DATA**

Data disajikan dalam bentuk foto dan dideskripsikan dengan kalimat.





## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### A. Hasil uji skrining dan uji sensitivitas *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*

Pada penelitian ini isolat *Escherichia coli* yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* berjumlah 10 sampel. Identifikasi kuman *Escherichia coli* menggunakan metode analisis biokimiawi. Dari 10 sampel *Escherichia coli* yang didapat kemudian dilakukan uji skrining *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* untuk mengetahui adanya penurunan sensitivitas terhadap cephalosporin generasi III. Antibiotika yang digunakan yaitu cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime dan aztreonam.

Setelah dilakukan uji skrining, kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan metode *Double Disk Synergy Test* dengan menggunakan antibiotika cefotaxime, ceftazidime dan augmentin yang merupakan kombinasi amoxicillin-asam klavulanat. Hasil positif ditandai dengan adanya sinergi berupa perluasan zona hambatan antara disk cephalosporin generasi III dengan augmentin (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Melalui metode *Double Disk Synergy Test* dapat terkonfirmasi *Escherichia coli* yang merupakan penghasil ESBLs berjumlah 4 sampel.

Keempat sampel *Escherichia coli* penghasil ESBLs berasal dari Poli Bedah, Bangsal Melati 3, Paviliun Cendana dan ruang instalasi PICU RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Semua sampel diambil dari isolat urin. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Dr. Moewardi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Distribusi sampel *Escherichia coli* penghasil ESBLs dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Distribusi sampel *Escherichia coli* penghasil ESBLs berdasarkan lokasi pengambilan sampel

No	Kode Sampel	Pasien	Lokasi	Isolat	No. CM
1	34 U	Tn. R	Poli Bedah	Urin	974854
2	46 U	Ny. S	ML 3	Urin	974064
3	153 U	Tn. S	CH	Urin	934691
4	164 U	An. L	PICU	Urin	968625

Hasil uji sensitivitas berdasarkan diameter zona hambat melalui metode *Double Disc Synergy Test* dapat dilihat pada tabel 2. Pada sampel pertama seperti yang ditunjukkan pada gambar 1, terlihat adanya zona bening di antara disk ceftazidime dan disk augmentin serta di antara disk augmentin dan disk cefotaxim. Pada sampel kedua seperti yang ditunjukkan pada gambar 2, zona bening berada di antara disk augmentin dan disk cefotaxime. Pada sampel ketiga seperti yang ditunjukkan pada gambar 3, zona bening berada di antara disk ceftazidime dan disk augmentin serta di antara disk augmentin dan disk cefotaxime. Pada sampel keempat seperti yang ditunjukkan gambar 4,

zona bening berada di antara disk ceftazidime dan disk augmentin serta di antara disk augmentin dan disk cefotaxime.

**Tabel 2.** Hasil uji sensitivitas dengan metode *Double Disc Synergy Test*

No.	Kode Sampel	Zona Diameter		
		Ceftazidime	Augmentin	Cefotaxime
1.	34 U	25 mm	24 mm	13 mm
2.	46 U	16 mm	23 mm	11 mm
3.	153 U	18 mm	27 mm	11 mm
4.	164 U	18 mm	22 mm	12 mm



**Gambar 1.** Sampel 34 U



**Gambar 2.** Sampel 46 U



**Gambar 3.** Sampel 153 U



**Gambar 4.** Sampel 164 U

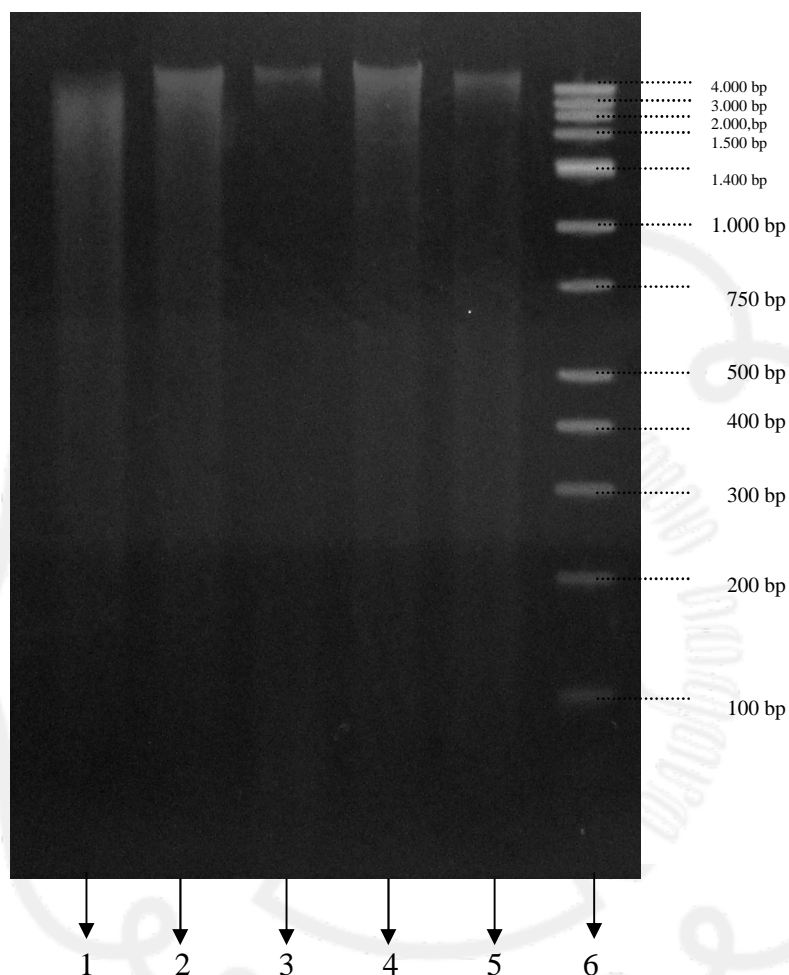
## **B. Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)***

Dari keempat sampel *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* yang telah teridentifikasi melalui metode *Double Disk Synergy Test* kemudian dilakukan ekstraksi DNA melalui proses elektroforesis. Sebagai kontrol digunakan kuman *Escherichia coli* standar (ATCC 11229) milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* disajikan pada gambar 5.

Pada hasil ekstraksi (gambar 5) sampel nomor 1, 2, 3, 4 adalah isolat *Escherichia coli* penghasil ESBLs. Sampel pertama berasal dari Poli Bedah, sampel kedua berasal dari Bangsal Melati 3, sampel ketiga berasal dari Paviliun Cendana dan sampel keempat berasal dari ruang instalasi PICU RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Sampel nomor 5 adalah kuman *Escherichia coli* standar (ATCC 11229) milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Nomor 6 adalah *Lambda DNA markers* 0.1–12 kbp Novagen.

Hasil elektroforesis pada Gambar 5 menunjukkan bahwa DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* berhasil diisolasi. Pita – pita DNA terletak berada di sekitar 4000 bp. Setelah

dipastikan bahwa DNA berhasil diisolasi, DNA tersebut kemudian dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* (Gambar 6).



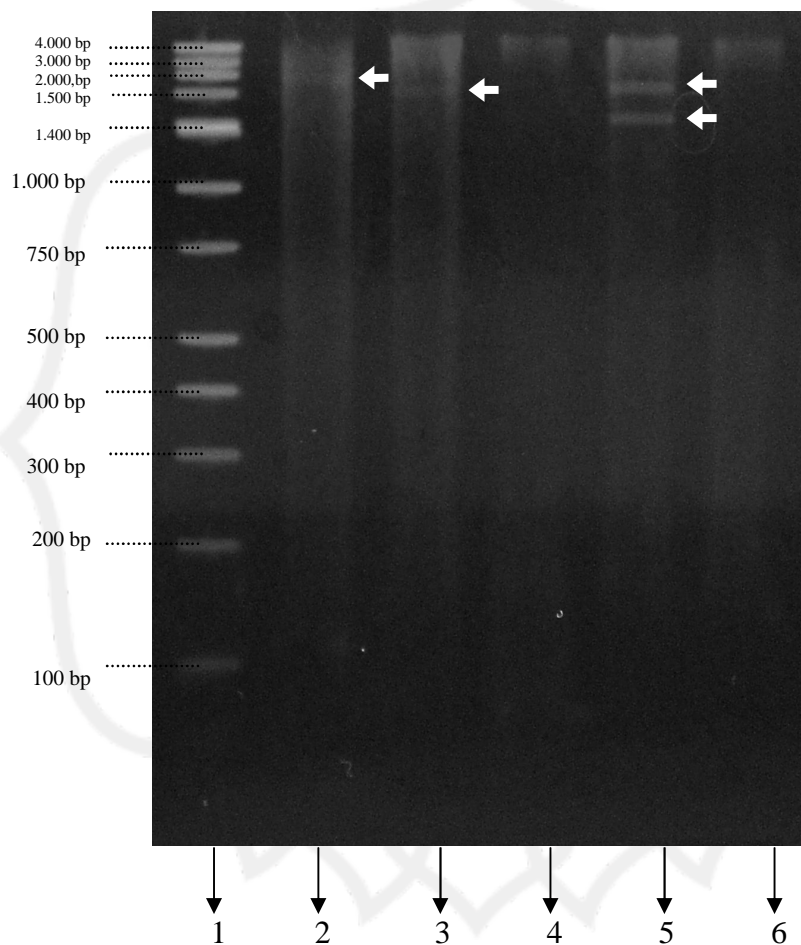
**Gambar 5.** Foto elektroforesis hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli*

Keterangan :

- 1) Sampel No. 1
- 2) Sampel No. 2
- 3) Sampel No. 3
- 4) Sampel No. 4
- 5) Sampel No. 5, *Escherichia coli* standar (ATCC 11229)
- 6) *Lambda DNA markers* 0.1–12 kbp Novagen

**C. Hasil digesti *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* menggunakan enzim restriksi *EcoRI***

Hasil penelitian polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* pada pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI* disajikan pada gambar 6.



**Gambar 6.** Foto elektroforesis hasil pemotongan DNA *Escherichia coli* dengan enzim restriksi *EcoRI*

Keterangan :

- 1) *Lambda DNA markers* 0.1–12 kbp Novagen
- 2) sampel No. 1
- 3) sampel No. 2
- 4) sampel No. 3
- 5) sampel No. 4
- 6) sampel No. 5, *Escherichia coli* standar (ATCC 11229)

Dari hasil elektroforesis pemotongan DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* dengan enzim restriksi *EcoRI*, didapatkan gambaran pita DNA yang berbeda dari kelima sampel yang ada. Pada sampel pertama didapatkan satu buah pita, yaitu dengan panjang sekitar 1.750 bp. Sampel kedua didapatkan dua buah pita DNA, pita pertama dengan panjang sekitar 3.000 bp, sedangkan pita kedua dengan panjang 1.500 bp. Sampel ketiga didapatkan satu buah pita DNA dengan panjang sekitar 4.000 bp. Pada sampel keempat didapatkan tiga buah pita, pita pertama dengan panjang 2.000 bp, pita kedua dengan panjang sekitar 1.500 bp, sedangkan pita ketiga dengan panjang sekitar 1.400 bp. Pada sampel kelima yang merupakan kuman *Escherichia coli* standar didapatkan satu buah pita DNA yaitu dengan panjang sekitar 4.000 bp.

## BAB V

### PEMBAHASAN

Untuk mengetahui adanya suatu polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* dilakukan reaksi restriksi dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Perbedaan panjang dan jumlah fragmen DNA yang terbentuk setelah reaksi pemotongan menunjukkan adanya polimorfisme.

Sebelum dilakukan reaksi pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*, sampel harus teridentifikasi sebagai *Escherichia coli*. Isolat yang telah didapat kemudian dilakukan identifikasi morfologi dengan menggunakan pewarnaan gram. Kuman yang terbukti merupakan kuman batang gram negatif kemudian diisolasi, setelah itu dikultur dan dilakukan identifikasi spesies dengan menggunakan reaksi biokimia. Media identifikasi yang digunakan ialah KIA, SIM, Urea dan Simon Sitrat. Pertumbuhan kuman pada media deret identifikasi diamati dan dicocokkan dengan tabel identifikasi kuman.

Hasil identifikasi yang menunjukkan kuman *Escherichia coli*, kemudian dilakukan skrining kuman penghasil ESBLs dengan beberapa antibiotika cephalosporin generasi III. Antibiotika yang digunakan yaitu cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime dan aztreonam. Untuk menentukan kuman tersebut merupakan *Escherichia coli* penghasil ESBLs dilakukan tes konfirmasi dengan menggunakan *Double Disk Synergy Test*. Antibiotika yang digunakan ialah



cefotaxim (30 µg), ceftazidim (30 µg), serta augmentin yang merupakan kombinasi amoxicillin-asam klavulanat (30 µg). Untuk menentukan konfirmasi fenotip dalam mengidentifikasi kuman penghasil enzim ESBLs, ketiga antibiotika ini diletakkan ke dalam media Muller Hinton Agar pada jarak masing-masing 25 mm. Sinergi berupa perluasan zona hambatan antara disk cephalosporin generasi III dengan disk kombinasi cephalosporin-asam klavulanat menunjukkan kuman tersebut positif ESBL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

Keempat sampel yang didapat dari poli bedah, bangsal melati 3, Paviliun Cendana dan ruang instalasi PICU RSUD Dr. Moewardi Surakarta menunjukkan adanya resistensi kuman *Escherichia coli* terhadap antibiotika cephalosporin generasi ketiga. Hal ini kemungkinan disebabkan akibat pemakaian antibiotika yang tidak rasional pada pasien yang dirawat di tempat tersebut. Penggunaan cephalosporin generasi ketiga dan aztreonam secara luas diyakini sebagai penyebab utama timbulnya resistensi terhadap antibiotika golongan β-laktam spektrum luas (Chaudhary dan Aggarwal, 2004)

Semua sampel yang teridentifikasi *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* dilakukan isolasi DNA. Hasil isolasi ini kemudian dielektroforesis dan didapatkan pita – pita DNA berada di sekitar 4000 *basepair* (bp) (Gambar 5). Hal ini memperlihatkan bahwa DNA yang terisolasi benar – benar DNA dari *Escherichia coli*. *Escherichia coli* adalah bakteri dengan satu molekul DNA sirkuler yang berukuran kurang lebih 4200 *basepair* (bp) (Tigr GenBank, 2006).

DNA *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* (*ESBLs*) yang telah berhasil diisolasi kemudian dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*. Hasil reaksi tersebut kemudian dielektroforesis menggunakan *agarose gel* 0,5 %. Dari hasil elektroforesis reaksi restriksi, didapatkan sampel *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* (*ESBLs*) yang diteliti terdapat polimorfisme.

Polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases* (*ESBLs*) ditunjukkan dari gambaran pita yang tidak sama pada masing-masing sampel (Gambar 6). Perbedaan tersebut terletak pada jumlah pita dan jarak pita (situs) dari sumuran. Jumlah pita yang didapat menunjukkan *restriction fragment*, sedangkan jarak pita (situs) dari sumuran menunjukkan panjang DNA hasil restriksi. Perbedaan jumlah *restriction fragment* dan situs DNA hasil restriksi diakibatkan oleh perbedaan urutan nukleotida yang mengakibatkan letak situs restriksi yang berbeda (Sambrook dan Russell, 2001).

Dari Gambar 6 yang merupakan hasil digesti, terlihat pita-pita DNA yang memiliki panjang DNA yang tidak sama. Pada sampel No. 1 terlihat pita DNA dengan panjang sekitar 1.750 bp. Sampel No.2 didapatkan dua buah pita DNA dengan panjang 3.000 bp dan 1.500 bp. Pada sampel No. 4 didapatkan tiga buah pita DNA dengan panjang 2.000 bp, 1.500 bp dan 1.400 bp.

Pada sampel No. 1 hanya terlihat satu buah pita DNA dengan panjang sekitar 1.750 bp. Hal ini kemungkinan dikarenakan DNA *Escherichia coli* terpotong menjadi ukuran yang sama panjang sehingga hanya terlihat satu buah pita DNA setelah dielektroforesis. Pada sampel No. 3 dan sampel No. 5 (kuman

*Escherichia coli* standar), terlihat hanya ada satu pita DNA dengan panjang sekitar 4.000 bp. Kemungkinan DNA *Escherichia coli* tidak terpotong dengan enzim restriksi *EcoRI* sehingga hanya muncul satu buah pita dengan panjang sekitar 4.000 bp. *Escherichia coli* adalah bakteri dengan satu molekul DNA sirkuler yang berukuran kurang lebih 4200 *basepair* (bp) (Tigr GenBank, 2006).

Dari hasil pemotongan tersebut terlihat adanya polimorfisme pada semua sampel *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*. Hal ini terlihat dengan adanya perbedaan panjang potongan fragmen DNA sampel yang diteliti jika dibandingkan dengan panjang potongan fragmen DNA *Escherichia coli* standar (Sampel No. 5).

Berbagai mutasi yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara serta menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel, hibridisasi dan visualisasi (Velasco, *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini kuman didapat dari tempat yang berbeda dengan paparan antibiotika yang berbeda pula. Sampel didapat dari Poli Bedah, Bangsal Melati 3, Paviliun Cendana serta Instalasi PICU dimana penggunaan antibiotik khususnya cephalosporin generasi III sangat luas. Paparan yang luas terhadap antibiotik cephalosporin generasi III mengakibatkan kuman mengalami mutasi dengan menghasilkan enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)*. Kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* ini resisten terhadap antibiotik cephalosporin generasi III.

Polimorfisme dapat diakibatkan oleh beberapa hal yang bisa mengakibatkan terjadinya mutasi di tingkat DNA antara lain karena paparan antibiotika yang berbeda, paparan lingkungan yang berbeda, maupun transfer genetik oleh plasmid (Cerero, *et al.*, 2008). Paparan yang berbeda tersebut mengakibatkan pola mutasi yang berbeda sehingga terjadi polimorfisme kuman *Escherichia coli* pada berbagai sampel yang diteliti. Mutasi yang terjadi mempunyai efek langsung pada genom bakteri dan efek tidak langsung terhadap fenotip. Efek langsung terhadap fungsi genom dapat diketahui berdasarkan ekspresi gen dan struktur gen. Efek tidak langsung bersifat lebih kompleks karena berkaitan dengan sifat fenotip organisme yang mengalami mutasi. Mutasi pada mikroorganisme dapat menghasilkan beberapa sifat fenotip, salah satunya mutan penghambat resistensi yang dapat mengalami resistensi terhadap efek toksik antimikroba atau antibiotik. Mutan ini menyebabkan ekspresi genom terus menerus. Selain itu, kebanyakan mutasi menyebabkan kematian bakteri, sedangkan yang lain tidak menimbulkan efek (Brown, 2002).

Adanya efek resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan efek yang sangat nyata serta menimbulkan permasalahan yang sangat kompleks. Oleh sebab itu perlu diperlukan penelitian biomolekuler yang lebih lanjut untuk mencari gen yang terlibat. Selain itu diperlukan penanganan yang lebih spesifik untuk mengendalikan pola resistensi kuman khususnya *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* terhadap antibiotika cephalosporin generasi III.

## **BAB VI**

### **PENUTUP**

#### **A. SIMPULAN**

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya polimorfisme *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* yang ditunjukkan dengan perbedaan panjang dan jumlah fragment DNA setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* dari kelima sampel yang diteliti.

#### **B. SARAN**

1. Penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan dengan metode biomolekuler yang lebih lanjut agar strain-strain *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* dapat diidentifikasi.
2. Pentingnya dilakukan uji konfirmasi kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* sebelum pemberian antibiotik agar mutasi kuman akibat pemakaian antibiotik yang kurang rasional dapat dihindari.
3. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai titik awal dari studi epidemiologi yang dapat digunakan untuk mengontrol dan mengawasi wabah akibat infeksi kuman penghasil *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)* yang resisten terhadap antibiotik golongan cephalosporin generasi III.

#### 4. DAFTAR PUSTAKA

##### 5.

6. Andrews, Jenny. 2004. *Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in Escherichia Coli and Klebsiella sp.* Guidance to Diagnostic Laboratories Laboratory Detection & Reporting of Bacteria with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. [http://www.bsac.org.uk/\\_db/\\_documents/HPA\\_ESBLs.pdf](http://www.bsac.org.uk/_db/_documents/HPA_ESBLs.pdf) (8Februari 2009).
- 7.
8. Biology Science. 2005. DNA. <http://www.science-projects.com/onionDNA.htm> (20 Februari 2009)
- 9.
10. Bitinaite, Jurate; Richard J. Roberts; Dana Macelis. 1998. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Research*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC331348/pdf/nar00184-0097.pdf>. (2 Mei 2009)
- 11.
12. Brooks, Geo F.; Butel, Janet S.; Morse, Stephen A. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23*. Jakarta : EGC, pp: 96-117
- 13.
14. Brown, T.A. 2002. *DNA in Genomes, Second Edition*.
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=genomes.figgrp.6026> (20 Februari 2009)
- 16.
17. Brussow H., Canchaya C., Hardt WD. 2004. [Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion](http://mmbbr.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=15353570). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (3): 560–602.
18. Bush, K., G. A. Jacoby, and Medeiros, A.A. 1995. *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39:1211–1233.
- 19.
20. Cerero, Lorena Lopez, Marina De Cueto, Carlos Saenz. 2008. Neonatal sepsis caused by a CTX-M-32-producing Escherichia coli isolate.
21. *Journal of Medical Microbiology*. <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/reprint/57/10/1303?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=nosocomial+e.+coli&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>
- 22.
- 23.
- 24.

25. Chaudhary, U., Aggarwal R. 2004. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) – An Emerging Threat to Clinical Therapeutics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. <http://medind.nic/iau/t04/i2> (30 Januari 2009)
- 26.
27. Coudron, P. E., Moland, E. S., Sanders, C. C. 1997. Occurrence and detection of ESBL in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center. *Journal Clinical of Microbiology*. 35:2593-2597
- 28.
29. Dewi, Akbar Pranita Kusuma. 2008. *Polimorfisme Staphylococcus aureus Isolat Lokal RSUD Pandan Arang Boyolali pada Pemotongan dengan Enzim Restriksi EcoRI*. Skripsi Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- 30.
31. Dwiprahasto, Iwan. 2005. Kebijakan Untuk Meminimalkan Risiko Terjadinya Resistensi Bakteri Di Unit Perawatan Intensif Rumah Sakit. *Jurnal Manajemen Pelayanan Kesehatan* (4) vol. 8.
- 32.
33. Gardner, Eldon J.; Snustad, Peter J. 2002. *Principles of Genetics 6<sup>th</sup> Edition*.  
New York, John Wiley and Sons, Inc. pp : 213-243.
- 34.
- 35.
36. Hill. 2000. *Restriction Enzyme*. [http:// www. plant-projects.com/kenaf-DNA.htm](http://www.plant-projects.com/kenaf-DNA.htm). (20 Februari 2009)
- 37.
38. Jacoby, George A.; Munoz, Price Luisa Silvia. 2007. The New  $\beta$ -Lactamases. *New England Journal of Medicine*. <http://www.nejm.org/> (28 Februari 2009)
- 39.
40. Jawetz, E.; Melnick J.; Aldenberg E. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : EGC, pp: 357-359.
- 41.
42. Kurpiewski, M. R., Engler, L. E., Wozniak, L. A. 2004. *Cleavage of mispaired heteroduplex DNA substrates by numerous restriction enzymes*. <http://www.horizonpress.com/cimb/v/v11/1.pdf> (4 Mei 2009)
- 43.
44. Laboratorium Mikrobiologi. 2004. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi II*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta
- 45.
46. Madappa, Tarun. 2009. *Escherichia coli Infections*. <http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview>  
(25 Februari 2009)
- 47.
- 48.

49. Medeiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clinical Infection Disease*. 24(Suppl 1):S19-45.
- 50.
51. Medeiros, A.A., and J. Crellin. 1997. Comparative susceptobility of clinical isolates producing extended spectrum beta-lactamases to ceftibuten. *Pediatric Infection Disease*. 16:S49-55
- 52.
53. Nathisuwan S., Burgess D.S., Lewis II J.S. 2001. ESBLs : Epidemiology, Detection and Treatment. *Pharmacotherapy*. 21(8): 921-928.
- 54.
55. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> informational supplement (M100-S15). *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
- 56.
57. Osamu, Nakashima; Kunihiro, Fukunichi; Kunihide, Gomi. 2004. Significance of Molecular Epidemiology of ESBLs Producing Gram Negatif Rods by Analyzing The Genome Type. *Journal of the Showa Medical Association*. Vol 64. pp : 332-339.
- 58.
59. Paterson, David L., Bonomo, Robert A. 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases : a Clinical Update. *Clinical Microbiology Review* vol 18. pp:657-686 <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/18/4/657> (30 Januari 2009)
- 60.
61. Paton J.C., Paton A.W. 1998. [Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections](#). *Clinical Microbiology Review*. 11 (3): 450-79. [PMID 9665978](#). [PMC 88891](#). <http://cmr.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=9665978>.
- 62.
63. Pena, Carmen; Pujol Miquel; Ardanuy Carmen. 1998. Epidemiology and Successful Control of a Large Outbreak Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Journal of Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. Pp : 53-58
- 64.
65. Primaningtyas, Widana. 2008. *Pola Resistensi Kuman Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) terhadap Obat Golongan Carbapenem*. Skripsi Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- 66.
67. Promega, 2005. *Technical Bulletin Wizard Genomic DNA Purification Kit*. <http://www.promega.com.htm>. (5 Februari 2009)
- 68.



69. Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiology*. 12 (9): 412–6.
- 70.
71. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed New York, NY: CSHL Press.
- 72.
73. Snustad, Peter D. 2000. *Principles of Genetics 2<sup>nd</sup> Edition*. New York, John Willey and Sons, Inc. pp: 225-231.
- 74.
75. Studier, Mark. 2000. *Simplified Protein Production Method Brings New Hopes For Future Medical Applications*. <http://www.bnl.gov/education/Contests/HSessay/linkableFiles/pdf/RosenthalEssay2007>. (8 April 2009)
- 76.
77. Taufiqurrahman, Muchammad Arief . 2004. *Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Klaten, CSGF. pp: 1-69.
- 78.
79. Tigr GenBank, 2006. *Escherichia coli Taxonomy*. <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntec38> (20 Maret 2009).
- 80.
81. Todar, Kenneth. 2008. *Pathogenic Escherichia coli in Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>. (9 April 2009)
- 82.
83. Tortora, Gerrard J., Funke, Berdell R., Case, Christine L. 2007 *Microbiology An Introduction 9<sup>th</sup> Edition*. Pearson Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. California.
- 84.
85. University Of Arizona. 2002. *Gel Electrophoresis*. <http://www.biology.arizona.edu/sciconn/lessons2> (12 Februari 2009)
- 86.
87. Velasco, C., Romero L., Martinez, Jose Manuel Rodriguez. 2006. Analysis of Plasmids Encoding Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalized patients in Seville. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 pp : 89-92. [http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(06\)00383-9/](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(06)00383-9/) (27 Desember 2009).
- 88.
89. Wikipedia. 2009. *Escherichia coli*.
90. [http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli) (20 Desember 2009)

94.

