

Deteksi Gen Resistensi Kloramfenikol (cat) pada *Pseudomonas aeruginosa* Isolat Klinik dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Tiana Milanda, Lisa K. Dewi, Sri A. F. Kusuma
Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri oportunistik Gram negatif yang menyebabkan infeksi pada mata, telinga, kulit, tulang, sistem saraf pusat, saluran pencernaan, sistem peredaran darah, jantung, sistem pernapasan, dan saluran kemih. Kloramfenikol saat ini tidak lagi digunakan sebagai obat pilihan karena banyaknya kasus resistensi terhadap antibiotik tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen resistensi kloramfenikol pada *P. aeruginosa* isolat klinik. Bakteri ini diisolasi dari nanah pasien otitis eksternal di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin (RSHS) Bandung. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR-koloni maupun PCR-DNA) digunakan untuk mendeteksi gen resistensi tersebut. Elektrogram dari produk PCR menunjukkan bahwa resistensi *P. aeruginosa* isolat klinik disebabkan oleh gen cat (317 pb). Berdasarkan hasil penelitian ini, gen cat dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi antibiotik kloramfenikol pada pasien otitis eksternal.

Kata kunci: cat, gen resistensi kloramfenikol, *polymerase chain reaction*, *Pseudomonas aeruginosa*

Detection of Chloramphenicol Resistance Genes (cat) in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with Polymerase Chain Reaction Method

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram negative bacteria, which may cause infection in eyes, ears, skin, bones, central nervous system, gastrointestinal tract, circulatory system, heart, respiratory system, and urinary tract. Recently, chloramphenicol is no longer used as the main option of the therapy due of its resistance case. The aim of this research was to detect the presence of gene which is responsible to chloramphenicol resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa*. These bacteria isolated from pus of external otitis patients in Hasan Sadikin Hospital in Bandung City. Polymerase Chain Reaction (PCR) method (colony-PCR and DNA-PCR) were performed to detect this resistance gene. Electropherogram from PCR products showed that the chloramphenicol resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa* was caused by cat gene (317 bp). Based on this research, cat gene may be used to detect the chloramphenicol resistance in patients with external ostitis.

Key words: cat, chloramphenicol resistance gene, polymerase chain reaction, *Pseudomonas aeruginosa*

Pendahuluan

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri batang Gram negatif, aerob, dan bergerak menggunakan flagel.^{1,2} Patogen oportunistik ini menyebabkan infeksi pada mata, telinga (otitis eksternal), kulit, tulang, sistem saraf pusat, saluran pencernaan, sistem peredaran darah (bakteremia dan septikemia), jantung (endokarditis), sistem pernapasan, dan saluran kemih.^{2,3}

Salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengatasi infeksi *P. aeruginosa* adalah kloramfenikol. Antibiotik ini bersifat bakteriostatik yang menghambat sintesis protein dengan mengganggu pembentukan kompleks asam amino-asil-tRNA dengan ribosom subunit 50S. Asosiasi peptidil transferase dengan asam amino tidak terjadi sehingga penambahan gugus asam amino yang baru pada proses pemanjangan rantai peptida akan terganggu.⁴ Akhir-akhir ini ditemukan banyak kasus resistensi *P. aeruginosa* terhadap kloramfenikol sehingga penggunaannya untuk mengatasi infeksi bakteri tersebut perlu dipertimbangkan.^{5,6}

P. aeruginosa mampu mensintesis enzim yang mengkatalisis proses asetilasi pada gugus hidroksil dalam struktur kloramfenikol, dengan menggunakan asetil koenzim A sebagai donor gugus asetil. Proses ini menghasilkan derivat asetoksi kloramfenikol yang tidak mampu berikatan dengan ribosom bakteri. Enzim tersebut dikode oleh gen kloramfenikol asetil transferase (cat) dalam suatu plasmid yang dapat dipindahkan antar bakteri melalui proses konjugasi.⁷ Deteksi gen cat dalam DNA *P. aeruginosa* dapat dilakukan melalui metode molekuler seperti metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Deteksi dilakukan dengan mengamplifikasi gen cat secara in vitro pada konsentrasi DNA yang sangat kecil. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen cat pada beberapa *P. aeruginosa* isolat klinik yang

resisten kloramfenikol melalui metode PCR, baik PCR-koloni maupun PCR-DNA.⁸ Penelitian ini akan digunakan sebagai dasar pemilihan terapi antibiotik yang sesuai pada pasien dengan kondisi otitis eksternal.

Metode

Sampel Klinik

Sampel klinik berupa nanah (pus) yang berasal dari dua pasien dengan gejala klinik otitis eksternal di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin (RSHS) Bandung. Pasien-pasien tersebut merupakan pasien rawat jalan yang belum menjalani terapi pengobatan. Pasien sudah memperoleh *informed consent* sebelum berpartisipasi dalam penelitian ini.

P. aeruginosa ATCC 27853 dari Balai Pengembangan Laboratorium Kesehatan Bandung digunakan sebagai kontrol bakteri yang sensitif terhadap kloramfenikol pada uji resistensi bakteri. Kontrol positif untuk proses PCR menggunakan plasmid *E. coli* BL21 pLysS yang mengandung gen cat yang diperoleh dari Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan berupa cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg (Oxoid), serbuk kloramfenikol pro injeksi 1 g/mL (Sanbe Farma), strip deteksi oksidase (Microbact), strip API 20E (BioMerieux), pereaksi Kovac (n-amil alkohol 75 mL, asam klorida 25 mL, dan p-dimetilamin-benzaldehida 5 g), indikator metil merah dan pereaksi Barrit A (5 g α-naftol dan 100 mL alkohol 96 %) dan B (KOH 40 %), isopropanol, etanol 70 %, Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), *primer forward* 5'-GGTCCAACCCATTGCTTTAC dan *primer reverse* 5'-CACGGAAAGAAA TCACAAC (Proligo), deoksinukleotida trifosfat/dNTP (MD Bio-Korea), Taq DNA polimerase (Stratagene), marka λ/EcoRI/

HindIII, dapar *loading* (40 g sukrosa dan bromfenol biru 0,25 %), agarosa (Boehringer Mannheim), natrium klorida, dan air suling ganda.

Medium

Medium yang digunakan adalah agar nutrisi 28 g/L (Oxoid), agar Mac Conkey 52 g/L (Oxoid), agar Mueller-Hinton 38 g/L (Oxoid), Simon Indol Medium/SIM 30 g/L (Oxoid) dan Triple Sugar Iron Agar/TSIA 65 g/L (Oxoid).

Isolasi, Identifikasi dan Pemurnian Bakteri dari Sampel Klinik

Kedua sampel klinik ditanamkan pada agar Mac Conkey dalam cawan petri, lalu dinkubasi selama 18–24 jam dalam inkubator bersuhu 37 °C. Uji presumtif dilakukan terhadap bentuk koloni. Penegakan hasil uji presumtif dilakukan melalui uji biokimia pada medium TSIA dan SIM (uji indol), uji oksidase menggunakan strip deteksi oksidase, serta uji biokimia menggunakan strip API 20E. Seluruh uji ini digunakan untuk membedakan *P. aeruginosa* dari bakteri batang Gram negatif lainnya, terutama *Enterobacteriaceae*.

Kedua bakteri digoreskan pada permukaan TSIA menggunakan jarum ose lalu ditusukkan sampai dasar tabung. Pada uji indol, satu ose bakteri ditusukkan pada medium SIM, diinkubasikan dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam lalu ditambahkan 10–12 tetes pereaksi Kovac. Reaksi indol positif jika terbentuk cincin merah di permukaan medium. Uji oksidase dilakukan dengan menotolkan koloni bakteri pada strip deteksi oksidase menggunakan tusuk gigi lalu diamati perubahan warna setelah 5 detik.⁹

Uji biokimia menggunakan strip API 20E diawali dengan mensuspensikan sejumlah koloni bakteri dalam larutan natrium klorida fisiologis. Setiap *microtube* dalam strip

diisi suspensi bakteri. Reaksi ADH, LDC, ODC, H₂S, dan URE dilakukan dengan mengisi suspensi sampai di batas bawah badan *microtube*, lalu ditambahkan sejumlah minyak mineral hingga *microtube* terisi penuh. *Microtube* lainnya harus diisi penuh pada bagian badan dan kepala. Seluruh strip diletakkan dalam penampakan lalu ditutup agar berlangsung reaksi anaerob. Pembacaan hasil dilakukan setelah strip diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator bebas CO₂.⁹

Apabila reaksi GLU negatif (berwarna biru atau hijau-biru) dan jumlah reaksi positif kurang dari tiga, maka bakteri tersebut bukan peragi karbohidrat. Bila reaksi GLU positif dan terdapat lebih dari tiga reaksi positif, maka dilakukan penambahan pereaksi. Pada TDA ditambahkan feri klorida lalu diamati ada tidaknya perubahan warna dari merah menjadi coklat secara cepat. Pada IND ditambahkan pereaksi Kovac, reaksi positif jika terbentuk cincin merah setelah 2 menit. Pereaksi Barrit ditambahkan pada VP lalu diamati ada tidaknya perubahan warna menjadi merah muda atau merah sekitar 10 menit. Pereaksi larutan A dan B ditambahkan untuk mereduksi nitrat pada GLU, reaksi positif (terbentuk asam) dengan terbentuknya warna merah setelah 2–3 menit. Apabila hasil reaksi tetap negatif maka ditambahkan serbuk seng. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk warna kuning setelah 10 menit.⁹ Kedua koloni *P. aeruginosa* isolat klinik ditanamkan kembali ke agar nutrisi, lalu diinkubasi selama 18–24 jam pada inkubator bersuhu 37 °C.

Uji Resistensi *P. aeruginosa* Isolat Klinik terhadap Kloramfenikol

Biakan murni dari *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dan 2 serta *P. aeruginosa* ATCC 27853 disuspensikan ke dalam larutan natrium klorida fisiologis. Kekeuhan dari suspensi

bakteri diatur menyerupai dengan kekeruhan Mc-Farland 0,5 yang berarti mengandung sekitar 1×10^8 sel bakteri per mL. Sebanyak 20 μL masing-masing suspensi bakteri disebarkan dengan menggunakan tangkai gelas bengkok (*spreader bent glass rod*). Setelah dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit, cakram antibiotik kloramfenikol 30 μg diletakkan di atas permukaan agar secara aseptis. Cawan diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C selama 18–24 jam, lalu diameter hambat diukur menggunakan jangka sorong.

Isolasi DNA Total *P.aeruginosa* Isolat Klinik 1

Sebanyak 1 mL biakan cair *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL, lalu tabung disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit untuk memperoleh endapan sel. Supernatan lalu dibuang, endapan sel disuspensikan kembali dalam 600 μL larutan pelisis inti sel, lalu diinkubasi dalam penangas air bersuhu 65°C selama 5 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang, pada campuran tersebut ditambahkan 3 μL larutan RNase, tabung dibolak-balik sebanyak 2–5 kali, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 15 menit. Setelah didinginkan sampai suhu ruang, campuran ditambahkan dengan 20 μL larutan pengendap protein lalu divorteks pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Campuran diinkubasi dalam penangas es selama 5 menit lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit.

Supernatan lalu dimasukkan ke tabung Eppendorf 1,5 mL baru yang sudah berisi 600 μL isopropanol, lalu tabung dihomogenkan sampai terlihat benang-benang halus berwarna putih. Tabung tersebut disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, endapan dikeringkan di atas kertas tisu dan ditambahkan 600 μL etanol 70% dingin, lalu tabung dihomogenkan untuk mencuci endapan DNA. Tabung disentrifugasi

pada 13.000 rpm selama 2 menit, lalu dibalikkan di atas kertas tisu. Larutan DNA *rehydration* ditambahkan untuk merehidrasi DNA, lalu tabung disimpan pada suhu $2-8^\circ\text{C}$.

Amplifikasi Gen cat dari *P. aeruginosa* Isolat Klinik dengan Metode PCR-koloni dan PCR DNA

Amplifikasi gen cat dengan metode PCR-koloni dilakukan terhadap koloni bakteri *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dan 2 serta *P. aeruginosa* ATCC 27853. Amplifikasi gen cat dengan metode PCR-DNA dilakukan terhadap DNA total dari *P. aeruginosa* isolat klinik 1. Proses amplifikasi memerlukan sepasang primer khusus, yaitu *primer forward* cat ($5'$ -GGTCCAACCCATTGCTTTAC- $3'$) dan *primer reverse* cat ($5'$ -CACGGAAAGAAATCACAAC- $3'$) yang dapat mengenali sekuens gen cat. Komponen reaksi PCR terdiri dari 0,5 μL *primer forward* cat 20 pmol dan 0,5 μL *primer reverse* cat 20 pmol, 0,5 μL dNTP 20 mM, 2,5 μL dapar Taq DNA *polymerase* 10x, 1,5 μL MgCl_2 25 mM, 0,2 μL Taq *polymerase* 5 unit/ μL , dan air suling ganda sebanyak 14,3 μL . Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.

Sampel yang diamplifikasi terdiri dari 5 sampel, yaitu sampel 1 berupa kontrol positif plasmid *E. coli* BL 21 *plysS* (3 μL plasmid dan 2 μL air suling ganda), sampel 2 berupa isolat DNA total dari *P. aeruginosa* isolat klinik 1 (5 μL), sampel 3, 4, dan 5 berupa koloni dari *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dan 2 serta *P. aeruginosa* ATCC 27853 (masing-masing 1 ose koloni dalam 5 μL air suling ganda). Proses amplifikasi gen cat dilakukan dengan menggunakan *thermocycler* (Parkin-Elmer) yang meliputi denaturasi awal 94°C selama 3 menit, 30 siklus PCR dengan tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, tahap penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit, dan tahap polimerasi fragmen DNA target pada



Gambar 1 Hasil Uji *Presumptive* Isolat Bakteri Klinik pada Medium Mac Conkey

suhu 72 °C selama 1 menit, diakhiri tahap polimerasi akhir 72 °C selama 10 menit.

Sebanyak 10 µL dari masing-masing produk PCR ditambahkan dapar *loading* sebanyak 1 µL lalu dimasukkan ke lubang-lubang pencadangan pada gel agarosa 1%. λ/EcoRI/Hind/III digunakan sebagai marka DNA. Elektroforesis dilakukan dalam dapar TAE 1x, pada tegangan 100 volt, kekuatan arus 400 mA, selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat di bawah sinar UV λ 312 nm menggunakan alat transilluminator UV (Cole-Palmer). Ukuran teoritis gen cat adalah sekitar 300 pb.¹⁰

Analisis Hasil Migrasi Produk PCR

Analisis dari hasil migrasi produk PCR pada elektroforegram dilakukan menggunakan

analisis regresi linier, sebagai sumbu x adalah jarak migrasi pita DNA dari lubang (cm) dan sumbu y adalah log jumlah pasangan basa DNA. Hubungan matematik antara kecepatan migrasi dan ukuran sekuens DNA adalah sebagai berikut:¹⁰

$$y = bx + a$$

Hasil

Isolasi, Identifikasi dan Pemurnian Bakteri dari Sampel Klinik

Uji *pre-sumptive* koloni isolat bakteri dari dua sampel klinik dapat dilihat pada Gambar 1. Kedua isolat bakteri membentuk koloni-koloni halus, basah, menghasilkan pigmen berwarna hijau cerah yang berdifusi ke dalam

Tabel 1 Hasil Uji Biokimia Koloni Isolat Bakteri pada Medium TSIA, SIM, dan Uji Oksidase

Isolat Bakteri	TSIA	SIM	Uji Oksidase
1	(-)	(-)	(+)
2	(-)	(-)	(+)



Gambar 2 Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri 1 Menggunakan Strip API 20E

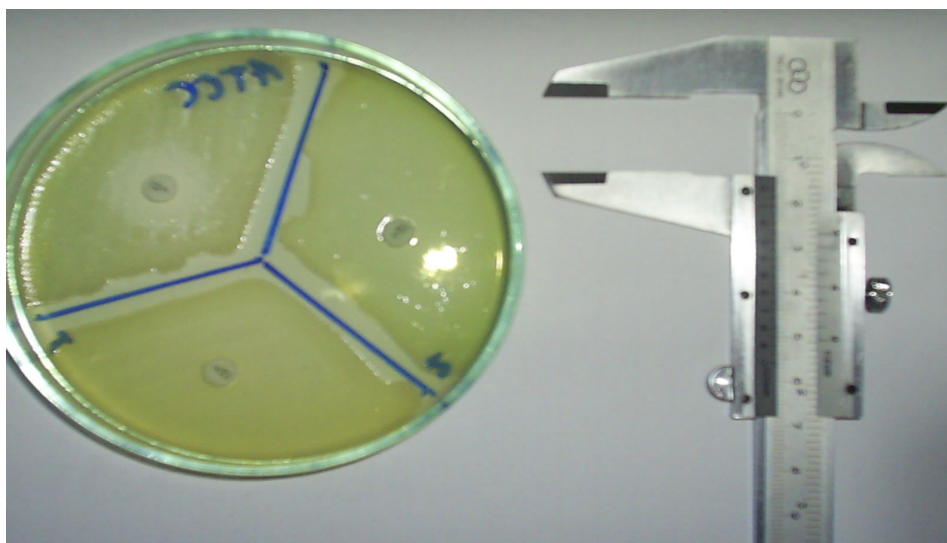
agar, dan mengeluarkan bau khas seperti anggur yang merupakan ciri khas dari *P. aeruginosa*.² Hasil uji biokimia kedua koloni yang diduga sebagai *P. aeruginosa* isolat klinik terdapat pada Tabel 1.

Hasil uji biokimia koloni isolat bakteri pada medium TSIA dan SIM memberikan

hasil negatif sedangkan hasil uji oksidase menunjukkan hasil positif. SIM yang merupakan semi-padat dapat juga digunakan untuk mengetahui keberadaan flagel. Pada SIM terdapat pergerakan bakteri yang ditunjukkan dengan terbentuknya kekeruhan di sekitar garis inokulasi. Hasil uji biokimia

Tabel 2 Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri 1 Menggunakan Strip API 20E

Uji	Senyawa aktif	Reaksi/Enzim	Hasil
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galakto Piranisida	β-galaktosidase	putih (-)
ADH	L-arginin	Arginin dihidrolase	merah (+)
LDC	L-lisin	Lisin dekarboksilase	kuning (-)
ODC	L-ornitin	Ornitin dekarboksilase	kuning (-)
CIT	Tri natrium sitrat	Penggunaan sitrat	biru (+)
H ₂ S	Natrium tiosulfat	Produksi H ₂ S	putih (-)
URE	Urea	Urease	kuning (-)
TDA	L-triptofan	Triptofan deaminase	kuning (-)
IND	L-triptofan	Produksi indol	kuning (-)
VP	Natrium piruvat	Produksi asetoin	putih (-)
GEL	Gelatin	Gelatinase	hitam (+)
GLU	D-glukosa	Fermentasi glukosa	hijau (-)
MAN	D-manitol	Fermentasi manitol	biru (-)
INO	Inositol	Fermentasi inositol	biru (-)
SOR	D-sorbitol	Fermentasi sorbitol	biru (-)
RHA	L-ramnosa	Fermentasi ramnosa	biru(-)
SAC	D-sukrosa	Fermentasi sakarosa	biru (-)
MEL	D-melibiosa	Fermentasi melibiosa	biru (-)
AMY	Amigladin	Fermentasi amigladin	biru (-)
ARA	L-arabinosa	Fermentasi arabinose	biru (-)



Gambar 3 Hasil Uji Resistensi *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *P. aeruginosa* Isolat Klinik terhadap Kloramfenikol dalam Medium Agar Mueller Hinton

isolat bakteri menggunakan strip API 20E dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2. Hasil pada Gambar 2 dan Tabel 2 menguatkan dugaan bahwa uji presumtif kedua isolat bakteri tersebut adalah *P. aeruginosa* isolat klinik.

Uji Resistensi *P. aeruginosa* Isolat Klinik terhadap Kloramfenikol

Hasil uji resistensi *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dan 2 terhadap kloramfenikol 30 µg dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 3. Hasil uji pada Tabel 3 menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* ATCC 27853 merupakan galur yang sensitif sedangkan *P. aeruginosa* isolat klinik 1 dan 2 merupakan galur resisten terhadap kloramfenikol.

Isolasi DNA Total *P. aeruginosa* Isolat Klinik 1

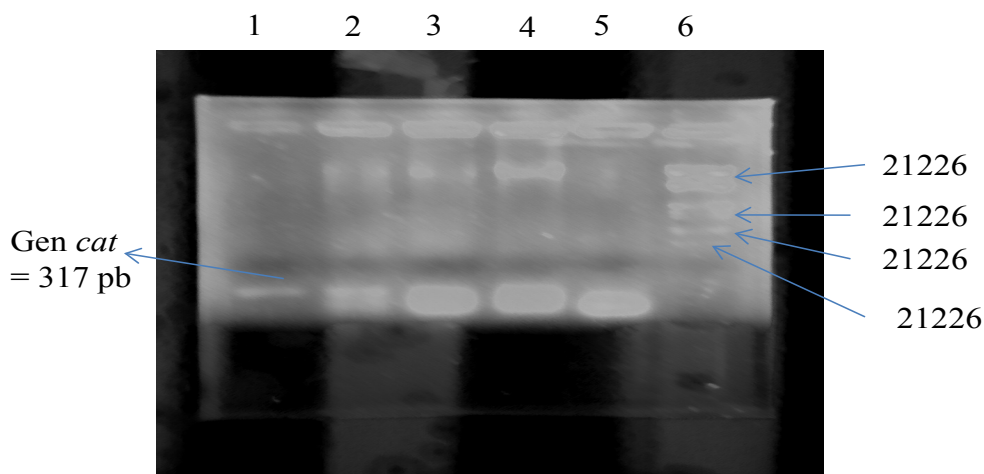
Hasil isolasi DNA total *P. aeruginosa* isolat klinik 1 yang terdeteksi dalam elektroforesis gel adalah 20 ng DNA/µL. DNA total tersebut digunakan sebagai templat untuk proses PCR-DNA.

Amplifikasi Fragmen dari *P. aeruginosa* Isolat Klinik dengan Metode PCR-koloni dan PCR DNA

Hasil deteksi produk PCR-koloni dan PCR-DNA di bawah sinar UV λ 312 nm menggunakan alat *transilluminator* UV (Cole-Palmer) menunjukkan pita-pita DNA dari sampel 2, 3, dan 4 sampel yang sejajar dengan pita DNA *E. coli* BL 21 plysS yang mengandung gen cat sebagai kontrol positif

Tabel 3 Hasil Uji Resistensi *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *P. aeruginosa* Isolat Klinik terhadap Kloramfenikol

Bakteri Uji	Diameter Hambat (mm)	Hasil
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18,1	Sensitif
<i>P. aeruginosa</i> 1	0	Resisten
<i>P. aeruginosa</i> 2	0	Resisten



Gambar 4 Elektroforegram produk PCR gen *cat* dari *P. aeruginosa*

Keterangan :

- 1: hasil PCR plasmid *E. coli* BL 21 plysS yang mengandung gen *cat*
- 2: hasil PCR-DNA *P. aeruginosa* isolat klinik 1
- 3: hasil PCR-koloni *P. aeruginosa* isolat klinik 1
- 4: hasil PCR-koloni *P. aeruginosa* isolat klinik 2
- 5: hasil PCR-koloni *P. aeruginosa* ATCC 27853
- 6: marka λ /EcoRI/Hind/III

(Gambar 4). Pita-pita DNA hasil PCR-koloni maupun PCR-DNA disertai adanya RNA di sekitar pita. Hal ini disebabkan jumlah RNase yang digunakan dalam proses isolasi DNA total masih kurang. Pada sampel 5 tidak terbentuk pita DNA dan hanya terlihat pita RNA karena *P. aeruginosa* ATCC 27853 merupakan galur yang sensitif.

Analisis Hasil Migrasi Produk PCR

Analisis hasil migrasi produk PCR dari *P. aeruginosa* isolat klinik dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5. Berdasarkan data pada Tabel 4, dapat dihitung konstanta a dan b pada persamaan regresi linier $y=bx+a$, sehingga

diperoleh persamaan $y=-0,435x+4,983$. Berdasarkan hasil ekstrapolasi data pada Tabel 5, maka diketahui ukuran pita DNA dari ketiga produk PCR adalah 317 pb.

Pembahasan

Kedua koloni *P. aeruginosa* isolat klinik pada agar Mac Conkey membentuk koloni-koloni halus, basah, menghasilkan pigmen berwarna hijau cerah yang berdifusi ke dalam agar dan mengeluarkan bau khas seperti anggur. Koloni tidak berwarna merah bata karena tidak mampu memfermentasikan laktosa dalam medium tersebut. Kombinasi kedua pigmen hijau-biru *P. aeruginosa* (pioverdin

Tabel 4 Hasil Migrasi Marka DNA λ /EcoRI/Hind/III

Urutan pita marka	Jumlah pasangan basa (pb) DNA	Log pb (y)	Jarak migrasi (x) (cm)
1	21226	4,33	1,5
2	5148	3,71	2,2
3	2027	3,31	3,6
4	1584	3,20	4,1

Tabel 5 Hasil Migrasi Produk PCR dari Gen cat *P. aeruginosa* Isolat Klinik

No. Lubang Pencadang	Log pb (y)	Jarak Migrasi (x) (cm)
2	2,5	5,65
3	2,5	5,65
4	2,5	5,65

dan piosianin) menghasilkan warna hijau cerah yang berdifusi ke dalam medium. Bau seperti buah anggur yang khas dapat membedakan bakteri tersebut dari jenis *Pseudomonas* lainnya.¹

Uji biokimia dari kedua koloni *P. aeruginosa* isolat klinik pada medium TSIA dan SIM memberikan hasil yang negatif sedangkan hasil tes oksidase menunjukkan hasil yang positif. Pada SIM terdapat pergerakan bakteri yang ditunjukkan dengan terbentuknya kekeruhan di sekitar garis inokulasi. Hasil TSIA memberikan nilai yang negatif karena bakteri tersebut tidak mampu memfermentasi gula dalam medium tersebut dan tidak dapat memproduksi hidrogen sulfida. *P. aeruginosa* memberikan hasil yang negatif terhadap uji indol pada medium SIM karena tidak mampu untuk menguraikan triptofan.

Pergerakan bakteri menunjukkan hasil yang positif karena *P. aeruginosa* bergerak menggunakan flagel. Bakteri ini memberikan hasil yang positif terhadap uji oksidase, yang ditunjukkan dengan perubahan warna pada strip deteksi oksidase dari tidak berwarna menjadi ungu-biru. Uji oksidase *P. aeruginosa* dari *Enterobacteriaceae* yang memberikan hasil oksidase negatif. Hasil tersebut dikuatkan oleh hasil uji biokimia yang menggunakan strip API 20E bahwa kedua isolat bakteri tersebut adalah *P. Aeruginosa*.⁹

Berdasarkan hasil uji resistensi dapat diketahui bahwa kedua koloni *P. aeruginosa* isolat klinik resisten terhadap kloramfenikol sedangkan koloni *P. aeruginosa* ATCC 27853 masih sensitif terhadap antibiotik tersebut. Diameter zona hambat teoritis untuk

kloramfenikol 30 µg terhadap *P. aeruginosa* yang sensitif adalah sebesar ≥ 18 mm, menengah sebesar 13–17 mm, dan resisten sebesar ≤ 12 mm atau tidak sama sekali terbentuk zona hambat.⁶

Amplifikasi dilakukan terhadap koloni maupun hasil isolasi DNA total dari *E. coli* isolat klinik. PCR koloni dilakukan sebagai langkah awal dari PCR untuk mengetahui keberadaan gen cat tanpa melakukan isolasi DNA total. Kelemahan metode ini adalah produk PCR dapat terganggu oleh adanya protein. Hal tersebut dapat diatasi dengan melakukan PCR-DNA, walaupun cara ini memerlukan langkah isolasi DNA total terlebih dahulu.⁸

Amplifikasi gen cat dalam *P. aeruginosa* isolat klinik dilakukan dengan menggunakan sepasang primer yang khusus dan dapat mengenali gen tersebut. Proses amplifikasi hanya akan berjalan apabila penempelan primer dilakukan dengan menggunakan suhu *annealing* yang tepat. Penentuan suhu *annealing* harus dioptimasi dengan cara mempertimbangkan panjang, urutan, dan jenis oligonukleotida primer. Semakin banyak kandungan basa G dan C, maka akan semakin tinggi suhu yang diperlukan.⁸

Berdasarkan hasil dari ekstrapolasi data, diketahui ukuran pita DNA dari produk PCR pada ketiga fragmen DNA *P. aeruginosa* adalah 317 pb. Ukuran fragmen DNA tersebut sesuai dengan literatur, amplifikasi fragmen DNA menggunakan primer cat 5'-CACGGAAAGAAATCACAAC 3' dan primer cat *forward* 5'-GGTCCAACC CATTGCTTTAC 3' akan menghasilkan pita DNA berukuran 317 pb.¹⁰

Simpulan

Hasil deteksi gen cat pada kedua koloni *P. aeruginosa* isolat klinik, baik dengan metode PCR koloni maupun PCR DNA menunjukkan adanya pita DNA berukuran 317 pb. Hal ini menunjukkan gen cat menjadi penyebab resistensi *P. aeruginosa* isolat klinik terhadap kloramfenikol. Perlu digunakan antibiotik alternatif untuk mengobati infeksi *P. aeruginosa* khususnya pada pasien dengan kondisi otitis eksternal.

Daftar Pustaka

1. Penna B, Thomé S, Martins R, Martins G, Lilenbaum W. In vitro antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1434–6. doi: 10.1590/S1517-838220110004000027
2. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol.* 2014;4:422. doi: 10.3389/fmicb.2013.00422.
3. Gorwitz RJ. Understanding microbes in sickness and health. *J Infect Dis.* 2009; 197:1226–34.
4. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Farmakologi dan terapi.* Edisi 5. Jakarta: Gaya Baru; 2007.
5. Gonçalves PS, Marques M, Pereira J, Cardoso O. Multidrug and extensive drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-year survey. *Microb Drug Resist.* 2014. doi:10.1089/mdr.2014.0137.
6. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2006;43(Supplement 2): S49–S56. doi: 10.1086/504477
7. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiolog Rev.* 2009;22(4):582–610. doi: 10.1128/CMR.00040-09
8. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros.* 2011;10(5):293–7. doi: 10.1016/j.jcf.2011.05.004.
9. Norman L. Biochemical test for identifying unknowns. MCB 2010 Course Website [Accessed on 27th July 2012]. Available at <http://web.fccj.edu/~lnorman/unknowns.htm?index=2#top>.
10. Winsor GL, Van Rossum T, Lo R, Khaira B, Whiteside MD, Hancock RE, et al. *Pseudomonas* genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(suppl 1): D483–D8. doi: 10.1093/nar/gkn861