

## **Identifikasi Gen Ctx-M pada *Escherichia Coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

**Yulianto Ade Prasetya**

Program Studi Analis Kesehatan STIKes Rumah Sakit Anwar Medika

Jalan Raya By Pass Krian Km. 33 Sidoarjo, (031) 99890135

\*Corresponding author email: yuliantoadeprasetya@gmail.com

### **ABSTRACT**

*Escherichia coli* producing *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) responsible for the high number of disease and death from nosocomial infections because of an enzyme encoded by genes CTX-M. This aim of the research to identity isolates *E.coli* of urine patients, which is a collection of Clinical Microbiology RSUD Dr. Soetomo Surabaya on the January-February 2014. The kind of the research use is observational descriptive with molecule approachment. The sample used is clinical isolate of *E.coli* producing ESBLs accumulated during January-February 2014 collection Clinical Laboratory RSUD Dr. Soetomo Surabaya that is thirty isolate. The methods used for the detection of genotypic by PCR thus electrophoresis and visualized on agarose gel 1.5%. The results show that twenty seven isolate (90%) positive containing a gen CTX-M with the highest number found on the Interna Departement. Detection Bacteria producing ESBLs in genotype important that therapy an antibiotic the patients given more effective and efficient.

**Keywords:** CTX-M, ESBLs, *Escherichia coli*, RSUD Dr. Soetomo Surabaya

© 2017 Jurnal Teknologi Laboratorium

### **ABSTRAK**

*Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) bertanggungjawab terhadap peningkatan morbiditas, mortalitas, dan wabah infeksi nosokomial karena adanya enzim yang dikode oleh gen CTX-M. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat klinik *E.coli* yang berasal dari urin pasien pada bulan Januari-Februari 2014. Jenis penelitian yang digunakan yakni deskriptif observasional dengan pendekatan molekul genetik. Sampel yang digunakan merupakan isolat klinik *E.coli* penghasil ESBLs yang terkumpul pada bulan Januari-Februari 2014 koleksi Laboratorium Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya yakni sebanyak tiga puluh isolat. Penelitian dilakukan di Tropical Disease Diagnostic Centre (TDDC) - Universitas Airlangga. Metode yang digunakan untuk deteksi gen CTX-M yakni dengan PCR, dielektroforesis, dan divisualisasikan pada agarose gel 1.5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari tiga puluh isolat yang digunakan, sebanyak dua puluh tujuh isolat (90%) positif mengandung gen CTX-M dengan prevalensi tertinggi ditemukan di Ruang Interna. Deteksi bakteri penghasil ESBLs secara genotip penting dilakukan supaya terapi antibiotik yang diberikan ke pasien lebih efektif dan efisien.

**Kata kunci :** CTX-M, ESBLs, *Escherichia coli*, RSUD Dr. Soetomo Surabaya

### **1. PENDAHULUAN**

Bakteri penghasil *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) menyebabkan resistensi antibiotik dengan menghidrolisis antibiotik golongan beta laktam terutama sefalosporin generasi ketiga dan keempat serta monobaktam (aztreonam) [1,2,3].

Prevalensi infeksi bakteri penghasil ESBLs semakin meningkat pada beberapa dekade terakhir di berbagai belahan dunia dan menjadi permasalahan serius di rumah sakit [3-4]. Hal ini disebabkan karena penggunaan antibiotik yang tidak rasional, kolonisasi bakteri dan lamanya perawatan di rumah sakit, lamanya penggunaan instrumentasi seperti kateter, dan tingkat keparahan penyakit seperti HIV/AIDS [2-3]. *Escherichia coli* merupakan patogen oportunistik yang selain menduduki posisi tertinggi penyebab insidensi infeksi saluran kemih [5], juga menduduki tertinggi bakteri penghasil ESBLs. *E.coli* penghasil ESBLs bertanggung jawab terhadap wabah infeksi nosokomial, peningkatan morbiditas dan mortalitas, serta peningkatan biaya kesehatan [6].

Gen CTX-M sangat aktif dalam menghidrolisis sefotaksim dan seftazidim [7]. Prevalensi gen CTX-M yang dihasilkan *E.coli* cukup tinggi di beberapa negara seperti di Thailand sebesar 87.3% [7], di Korea sebanyak 41 isolat yang positif mengandung gen CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, dan CTX-M-9 [8], di Rusia sebesar 93% dengan jumlah 248 isolat *E.coli* positif CTX-M-1 [9]. *Escherichia coli* penghasil ESBLs dari RSUD Dr. Soetomo Surabaya telah berhasil diidentifikasi dan dikonfirmasi secara fenotipik menggunakan DDST (*Double Disk Synergy Test*) dan perangkat Phoenix. Sebanyak tiga puluh isolat *E.coli* penghasil ESBLs ditemukan di berbagai ruang yakni Ruang Interna, Anak, Instalasi Rawat Jalan (IRJ), Bedah, Paru, Jiwa, Kulit, dan Saraf. Selain secara fenotipik, identifikasi bakteri penghasil ESBLs secara genotipik penting dilakukan untuk mendeteksi subtype ESBLs sehingga memudahkan pemberian antibiotik secara tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen CTX-M pada isolat klinik *E.coli* penghasil ESBLs di berbagai ruang RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

## **2. METODE PENELITIAN**

### **2.1. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yakni observasional deskriptif dengan pendekatan molekul genetik. Sebanyak tiga puluh isolat klinik *E.coli* penghasil ESBLs yang berasal dari urin pasien dan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Klinik bulan Januari- Februari 2014 dari beberapa ruang di RSUD Dr. Soetomo Surabaya (Tabel 1).

### **2.2. Instrumen**

Instrumen yang digunakan kultivasi *E.coli* berupa tabung reaksi, jarum Ose, cawan Petri, Bunsen, dan inkubator. Instrumen untuk ekstraksi DNA terdiri dari *hot plate*, *microsentrifuse*, mikrotube, Erlenmeyer, dan lemari pendingin. Instrumen untuk amplifikasi DNA berupa PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Elektroforesis, UV *Transilluminator*, dan *Rotary Shaker*.

### **2.3. Reagen**

Kultur *E.coli* menggunakan media Mueller Hinton agar yang telah ditambahkan sefotaksim 0.002 mg/ml. Mueller Hinton yang telah disterilkan dalam autoklaf ditambahkan sefotaksim secara aseptis dalam *laminar air flow*. Amplifikasi DNA bakteri menggunakan reagen yang siap pakai yakni PCR Mastermix sebanyak 12.5 µl yang terdiri dari 0.5 U Taq polymerase, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dan Buffer 1x. Reagen untuk elektroforesis berupa 1.5% agarose gel yang dibuat dengan mencampurkan 0.75 g Agarose *ultrapure* dengan 1x TAE Buffer (Tris Base 242.0 g ditambahkan asam asetat glasial 57.1 ml dan dilarutkan dengan 0.5 M EDTA pH 8.00).

### **2.4. Prosedur Kerja**

#### **2.4.1. Kultur sel dan Panen Sel**

Sebanyak tiga puluh isolat klinis koleksi Laboratorium Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang berasal dari beberapa ruang dilakukan subkultur dalam medium *Mueller Hinton agar* dengan penambahan sefotaksim 0.002 mg/ml selama 48 jam suhu 37 °C. Satu ose koloni yang tumbuh untuk disuspensikan dalam 0.1 ml aquadest steril dalam mikrotube dan diinkubasi dalam *hot plate* suhu 100°C selama 5 menit untuk melisis sel. Sel yang telah lisis kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000

identifikasi gen CTX-M..... (Yulianto A. Prasetya)

rpm selama 5 menit dalam suhu ruang. Supernatan yang terbentuk diambil secara hati-hati sebanyak 15 µl dan digunakan untuk *template Polymerase Chain Reaction* (PCR) [4]. Ekstrak DNA disimpan dalam suhu -20°C.

#### 2.4.2. Amplifikasi PCR

DNA yang digunakan sebagai *template* yakni 5 µl. Primer yang digunakan yakni 5'-ATGTGCAYACCAGTAARGT-3' dan 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'. Campuran untuk reaksi PCR dengan volume 25 µl yang terdiri PCR *Mastermix* 12.5 µl (0.5 U *Taq Polymerase*, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> dan Buffer 1x), 1.25 µl untuk masing-masing primer dan 5 µl DNA *template*. Kondisi PCR yang digunakan yakni denaturasi awal pada suhu 94°C selama 7 menit kemudian diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari 96°C selama 50 detik (denaturasi), 50°C selama 40 detik (*annealing*) dan 72°C selama 1 menit (ekstensi) dan diuikuti dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

#### 2.4.3. Visualisasi produk PCR dan Analisis Data

Produk hasil PCR divisualisasikan dalam agarose 1.5%. Sebanyak 5 µl produk PCR dicampur diatas *parafilm* dan ditambahkan 1 µl marker kemudian direndam dalam larutan Ethium Bromida selama 10 menit di tempat gelap. Amati produk PCR yang terbentuk dengan *UV Transilluminator* dengan panjang gelombang 360 nm.

#### 2.4.4. Analisa Data

Data yang terkumpul kemudian dianalisis secara deskriptif, dimana hasil DNA yang positif ditunjukkan dengan ampikon sebesar 593 bp. Kontrol negatif (N) yang digunakan adalah aquadest steril. Marker (M) yang digunakan merupakan DNA *ladder* sebesar 1000 bp (Gambar 1).

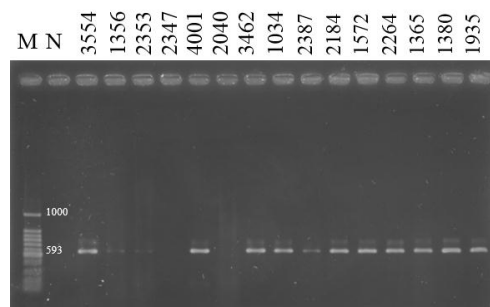
### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel isolat klinik *E.coli* yang berasal dari urin pasien digunakan karena bakteri ini banyak menginfeksi saluran kemih pasien dan menduduki posisi tertinggi bakteri penghasil ESBLs. Penelitian tahun 2005 menunjukkan bahwa sampel urin banyak mengandung *E.coli* penghasil ESBLs sebesar 67.1% [10] sedangkan pada tahun 2011 sebesar 26.5 % serta menduduki posisi tertinggi setelah pus dan darah [1]. Hal yang sama juga ditemukan di Spanyol yakni sebesar 89% dimana 68.8% berasal dari urin wanita [11]. *E.coli* penghasil ESBLs menyebabkan pilihan terapi antibiotik semakin terbatas terutama untuk individu usia lanjut dan *immunocompromised* [12]. Penambahan cefotaksim pada medium kultur yakni sebagai stimulator plasmid *E.coli* penghasil ESBLs, dimana gen pengkode resistensi banyak terdapat di plasmid R dan transposon [13].

**Tabel 1.** Distribusi Keberadaan Gen CTX-M isolat klinik *E.coli* di berbagai ruang RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Ruang	Jumlah Isolat (%)	Gen CTX-M (%)
Interna	13 (43%)	11 (41%)
Anak	4 (14%)	3 (11%)
IRJ	5 (17%)	5 (18%)
Bedah	1 (3%)	1 (4%)
Paru	4 (14%)	4 (14%)
Jiwa	1(3%)	1 (4%)
Kulit	1(3%)	1 (4%)
Saraf	1(3%)	1 (4%)
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>27</b>

Sumber: Data Primer Terolah



**Gambar 1.** Hasil PCR gen CTX-M *Escherichia coli* dengan amplicon sebesar 593 bp. M adalah marker 1000 bp. N merupakan kontrol negatif. Sumber: Data Primer Terolah

*E.coli* penghasil ESBLs yang mengandung gen CTX-M banyak ditemukan di Ruang Interna sebesar 11 isolat (41%) dan diikuti dengan Ruang IRJ sebesar 18%

(Tabel 1). Perbedaan isolat *E.coli* penghasil ESBLs dapat disebabkan penggunaan antibiotik yang berbeda-beda di masing-masing ruang perawatan. Penggunaan sefalosporin generasi ketiga, antibiotik beta-laktam, dan flurokuinolon di rumah sakit diduga menjadi faktor resiko munculnya bakteri penghasil ESBLs. Selain itu, penggunaan antibiotik pada komunitas juga diduga penyebab penyebaran bakteri penghasil ESBLs semakin meningkat [14]. Presentase prevalensi gen CTX-M dalam penelitian ini ditemukan sebesar 90% (27/30). Presentase ini sangat tinggi dan mengkhawatirkan karena pilihan terapi menjadi terbatas sehingga angka morbiditas dan mortalitas menjadi tinggi. Perjalanan anak benua India dan Timur tengah diduga terkait dengan resiko tinggi dari penyebaran infeksi ESBLs gen CTX-M. Impor makanan yang berasal dari hewan yang terkontaminasi bakteri pengkode gen ini merupakan rute lain dari penyebaran bakteri penghasil ESBLs yang membawa gen CTX-M [15]. Presentase pada penelitian ini meningkat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya sebesar 36.8% yang positif mengandung gen CTX-M-15 [10].

Tiga isolat yang tidak teridentifikasi gen CTX-M bukan berarti tidak menghasilkan ESBLs, kemungkinan mengandung gen lain seperti OXA, PER, TEM, SHV, ataupun GES [4]. Penelitian di tahun 2005 menunjukkan bahwa bakteri penghasil ESBLs di RSUD Dr. Soetomo resisten terhadap cefixim, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidim, cefamandole dan ciprofloxacin [1], sehingga bakteri tersebut positif memproduksi ESBLs namun bukan dikode oleh gen CTX-M. Mayoritas gen CTX-M juga membawa gen ko-resistensi lain karena plasmid yang membawa gen ini yakni tipe plasmid IncFII merupakan plasmid besar dan membawa gen resistensi antibiotik golongan lain [15]. Gen ini dapat berasosiasi dengan gen TEM, OXA, dan aac-(6)Ib [4], sehingga perlu mendapat perhatian terhadap penanganan pasien yang positif terinfeksi bakteri penghasil ESBLs. Pemeriksaan genotipik pada bakteri penghasil ESBLs dipandang perlu, karena tipe gen penghasil ESBLs yang berbeda membutuhkan terapi antibiotik yang berbeda pula.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan dari penelitian ini yakni sebesar 90% (27/30) isolat *E.coli* penghasil ESBLs positif mengandung gen CTX-M dengan prevalensi tertinggi ditemukan di Ruang Interna sebanyak 11 isolat dan dilanjutkan di Ruang IRJ sebanyak 5 isolat, Ruang Paru sebanyak 4 isolat, Ruang Anak sebesar 3 isolat, dan Ruang Bedah, Ruang Jiwa, Ruang Kulit, dan Ruang Saraf dengan jumlah isolat positif mengandung gen CTX-M sama yakni sebesar 1 isolat. Saran untuk penelitian selanjutnya yakni dilakukan identifikasi gen pengkode ESBLs lain seperti OXA, GES, dan PER. Klinisi juga perlu memperhatikan terapi antibiotik pada pasien sebaiknya tidak hanya mengandalkan pemeriksaan rutin secara fenotipik.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] K. Kuntaman, S. Santoso, H. Wahjono, N. Mertaningsih, E. Lestari, H. Farida, R. Hapsari, S. Firmanti, A. Noorhamdani, D. Santosaningsih, P. Purwono and D. Kusumaningrum, "The sensitivity pattern of extended spectrum beta lactamase producing bacteria against six antibiotics that routinely used in clinical setting," *Journal Indonesian Medical Association*, pp. 482-486, 2011.
- [2] J. Sharma, M. Sharma and P. Ray, "Detection of TEM and SHV genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a tertiary care hospital from India," *Indian Journal of Medical Research*, no. 132, pp. 332-336, 2010.
- [3] B. E. Bali, L. Acik and N. Sultan, "Phenotypic and Molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended spectrum beta lactamases produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella* isolates in Turkish Hospital," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 8, no. 4, pp. 650-654, 2010.

- [4] T. Sana, K. Rami, B. Racha, D. Fouad, A. Marcel, M. Hasan, H. Sani and H. Monzer, "Detection of genes TEM, OXA, SHV, and CTX-M in 73 clinical isolates of *Escherichia coli* producers of extended spectrum beta lactamases and determination of their susceptibility to antibiotics," *iMedPub Journals*, vol. 1, no. 1, pp. 1-5, 2011.
- [5] N. Jan, U. Sudhir and K. Archana, "Plasmid profile analysis of multidrug resistance *E.coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India," *Romanian Biotechnological Lettes*, vol. 5, no. 14, pp. 4635-4640, 2009.
- [6] C. Wollheim, I. Guerra, V. Conte, S. Hoffman, F. Schreiner, A. Delamare, A. Barth, S. Echeverrigaray and S. Costa, "2011," *Braz J. Infect Dis*, vol. 2, no. 15, pp. 138-143, 2011.
- [7] P. Kiratisin, A. Apisarnthanarak, C. Laesripa and P. Saifon, "Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying health care-associated infection in Thailand," *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, no. 52, pp. 2818-2824, 2011.
- [8] J. Kim, Y. Lim, Y. Jeong and Y. Seol, "Occurance of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 Extended Spectrum Beta Lactamases in Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Korea," *Antimicrob. Agents Chemother*, vol. 4, no. 49, p. 1572, 2005.
- [9] M. Edelstein, M. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein and L. Stratchounski, "Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 12, no. 47, pp. 3724-3723, 2003.
- [10] J. Severin, N. Mertaningsih, K. Kuntaman, E. Lestari, M. Purwanta, N. Toom, D. Duerink, U. Hadi, A. Belkum, H. Verbrugh and W. Goessens, "Molecular characterization of extended spectrum beta lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya," *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, no. 65, pp. 465-469, 2010.
- [11] A. Sorlozano, J. Guteirrez, J. Luna, J. Oteo, J. Liebena, M. Soto and G. Piedrola, "High presence of extended specgtrum beta lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*," *Microbiology Research*, no. 162, pp. 347-354, 2007.
- [12] C. Ferreira, W. Ferreira, N. Almeida, F. Gomes, Navacea and M. Barbosa, "Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Bacteria Isolated from Hematologic Patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil," *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 1076-1084, 2011.
- [13] S. T. Pratiwi, Mikrobiologi Farmasi, Jakarta: Erlangga, 2008.
- [14] M. Adelyap, S. Harbart, N. Vernaz, M. Kearney, M. Scott, F. Elhajji, A. Aldiab and J. Mc Elnay, "The impact of antibiotic use on the incidence and resitance pattern of extended spectrum beta lactamase-producing bacteria in primary and secondary healthcare settings," *Bristish Journal of Clinical Pharmacology*, pp. 1365-2125, 2011.
- [15] P. Rao, CTX-M Beta Lactamases, Davangere: Department of Microbiology, 2012.