



IDENTIFIKASI GEN *bla*GES PADA ISOLAT KLINIS *Pseudomonas aeruginosa*

Identification of *bla*GES Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Wahyunita Do Toka*

Departemen Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Khairun, Ternate, Maluku Utara

*E-mail : unyta.ilham@gmail.com

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative, aerobic, non-fermenter, motile bacillus that inhabits a wide variety of environments and is also known as an opportunistic pathogen in humans. Currently, clinicians are faced with the increasing number of *P. aeruginosa* infections that are resistant to all or almost all β -lactam antibiotics, aminoglycosides, and quinolones. The *bla*GES is one of the ESBL genes types found in *P. aeruginosa* and it is on increasing in several countries. This study was conducted to evaluate the antibiotic sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa* strains in a hospital in Makassar and detection of the *bla*GES gene using the PCR method. A total of 85 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* specimens were taken from several body parts were detected using the Vitek-2-compact. Antibiotic susceptibility testing was carried out automatically using a Vitek-2-compact as recommended by CLSI standards. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to identify the *bla*GES genes. The positive results of the *bla*GES gene encoding ESBL in *Pseudomonas aeruginosa* require a further comprehensive study to correlate the gene encoding ESBL with the sensitivity pattern of antibiotics to prevent the spread of infections by this organism.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL), *bla*GES, Polymerase chain reaction (PCR).

ABSTRAK

Pseudomonas aeruginosa adalah basil gram negatif, aerobik, non-fermentasi, motil yang menghuni berbagai lingkungan dan juga dikenal sebagai patogen oportunistik pada manusia. Saat ini, dokter dihadapkan pada meningkatnya jumlah infeksi *P. aeruginosa* yang resisten terhadap semua atau hampir semua antibiotik β -laktam, aminoglikosida, dan kuinolon. *Bla*GES merupakan salah satu tipe gen ESBL yang ditemukan pada *P. aeruginosa* dan jumlahnya terus meningkat di beberapa negara. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi sensitivitas antibiotik pada strain *Pseudomonas aeruginosa* di salah satu rumah sakit di Makassar dan mendeteksi gen *bla*GES menggunakan metode PCR. Sebanyak 85 spesimen isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari beberapa bagian tubuh yang dideteksi menggunakan Vitek-2-compact. Pengujian kerentanan antibiotik dilakukan secara otomatis menggunakan Vitek-2-compact seperti yang direkomendasikan oleh standar CLSI. *Polymerase chain reaction* (PCR) dilakukan untuk mengidentifikasi gen *bla*GES. Hasil positif dari *bla*GES Gen penyandi ESBL pada *Pseudomonas aeruginosa* memerlukan kajian lebih lanjut yang komprehensif untuk mengkorelasikan gen penyandi ESBL dengan pola sensitivitas antibiotik untuk mencegah penyebaran infeksi oleh organisme ini.

Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL), *bla*GES, Polymerase chain reaction (PCR).



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PENDAHULUAN

Resistensi antibiotik saat ini menjadi masalah kesehatan global, baik di negara maju maupun berkembang (Bavasheh dan Karmostaji, 2017; Shankar dan Balasubramaniam, 2014). Meningkatnya angka resistensi pada bakteri, khususnya bakteri Gram-negatif, sebagian besar dimediasi oleh plasmid sehingga penyebarannya sangat cepat pada populasi bakteri (Pobiega *et al.*, 2014).

Pseudomonas aeruginosa merupakan basil Gram-negatif, aerobik, oksidase-positif, non-fermentatif, dan motil yang dapat ditemukan di berbagai lingkungan serta dikenal sebagai patogen oportunistik pada hewan dan manusia (Azimi *et al.*, 2016). Bakteri ini memiliki kebutuhan nutrisi minimal, mampu bertahan pada berbagai kondisi fisik, serta dapat membentuk biofilm pada permukaan biotik maupun abiotik (Ahmed dan Asghar, 2017).

Saat ini, dokter dihadapkan pada meningkatnya jumlah infeksi *P. aeruginosa* yang resisten terhadap seluruh atau hampir seluruh antibiotik β -laktam, aminoglikosida, dan kuinolon (Tam *et al.*, 2010). Beberapa mekanisme yang memengaruhi resistensi β -laktam pada *P. aeruginosa* meliputi produksi enzim β -laktamase, perubahan target antibiotik, serta penurunan permeabilitas membran dan penyerapan antibiotik intraseluler (Lin *et al.*, 2012).

Jenis extended-spectrum β -laktamase (ESBL) yang telah ditemukan pada *P. aeruginosa* antara lain blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, blaPER, blaBEL, dan blaGES (Olowe dan Adefioye, 2014). β -laktamase blaGES-1 pertama kali terdeteksi pada isolat *Klebsiella pneumoniae* di Prancis pada tahun 1998 dan kemudian dilaporkan pada *P. aeruginosa* dari berbagai wilayah geografis. Gen blaGES-1 memberikan profil resistensi terhadap sefalosporin spektrum luas, termasuk kombinasi dengan inhibitor β -laktamase seperti asam klavulanat dan tazobaktam, serta terhadap imipenem. Secara umum, gen blaGES memiliki variasi yang dapat mengode ESBL maupun karbapenemase, dan keberadaan integron sebagai kerangka genetik berperan penting dalam penyebaran resistensi terhadap antibiotik β -laktam spektrum luas (Ahmed dan Asghar, 2017).

Penelitian ini merupakan penelitian pertama di Sulawesi Selatan, Indonesia, yang bertujuan mendeskripsikan pola sensitivitas antibiotik serta mendeteksi gen blaGES pada strain *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi secara klinis menggunakan metode polymerase chain reaction (PCR).

METODE

Desain, tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian cross sectional. Sebanyak 85 spesimen isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari beberapa bagian tubuh yaitu sputum, urin, nanah, darah, bilas lambung, cairan pleura, bilasan bronkus, cairan asites, sekret telinga, dan jaringan yang dideteksi menggunakan Vitek-2-compact. Pemeriksaan kultur bakteri dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo. Isolat merupakan pengambilan sampel pada bulan Januari 2019 hingga September 2019 di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, Sulawesi Selatan.

Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan adalah sentrifuge, rotator, mikropipet (1000 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l) dan tip steril, microwave, mesin PCR (Biorad), mesin elektroforesis, waterbath, Gel Doc, tabung eppendorf, tabung erlenmeyer, tabung PCR, laminar flow, gelas ukur, BSC tipe II, dan cetakan agarosa. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel, larutan oligonukleotida primer, enzim PCR (Go Taq Green), RNase free water, agarose, Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer 0,5, Etidium Bromida 5 μ l, loading dye, dan DNA ladder 100bp.

Langkah-Langkah Penelitian

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom untuk PCR dilakukan sesuai dengan instruksi manual Kit Ekstraksi DNA gSync (Geneaid Biotech Ltd). Suspensi bakteri terlebih dahulu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian disentrifugasi dan ditambahkan Proteinase K kemudian diinkubasi pada suhu 60°C. Untuk lisis sel, 200 μ l buffer GSB digunakan. Pada tahap pengikatan DNA digunakan 200 μ l etanol 96% dan larutan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm selama 1 menit. Sampel dicuci dengan menambahkan 400 μ l buffer W1, disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm, wash buffer sebanyak 600 μ l, disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm. Tahap elusi dilakukan dengan menambahkan 100 μ l buffer elusi, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm selama 30 detik. Cairan dalam tabung eppendorf merupakan produk DNA yang siap untuk PCR.

Reaksi berantai polimerase (PCR)

PCR untuk mendeteksi gen ESBL (blaGES) menggunakan primer dari IDT Integrated DNA Technologies (IDT, Singapura). Primer GES-F (5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3') dan GES-R (5'-CTATTTGTCCGTGTCCAGG-3') digunakan untuk blaGES amplifikasi. Proses amplifikasi dilakukan

dengan menggunakan enzim PCR dari KAPA2G Fast Multiplex Mix (KapaBiosystems, Afrika Selatan). PCR dilakukan dalam volume 25 µl reaksi PCR yang mengandung 12,5 µl master mix Taq PCR dengan buffer standar, 1 µl primer gen blaGES, dan 5 µl cetakan DNA. Kondisi reaksi PCR sebagai berikut: pra-denaturasi 1x pada suhu 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus amplifikasi dimana tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap annealing pada suhu 62°C selama 1 menit, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap ekstensi akhir dilakukan satu kali pada suhu 72°C selama 10 menit.6 Visualisasi produk PCR dilakukan pada elektroforesis gel agarosa 2% yang diwarnai dengan etidium bromida (2 g/ml). Elektroforesis dilakukan pada 100V selama 60 menit dalam larutan TBE. Gel divisualisasikan di bawah transilluminator UV (Gel Doc). Tangga DNA 100 bp (New England Bio Labs) digunakan sebagai penanda berat molekul DNA.

Pengolahan dan analisis data

Data penelitian gen GES diolah dan dianalisa menggunakan SPSS IBS (version 26), kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

HASIL

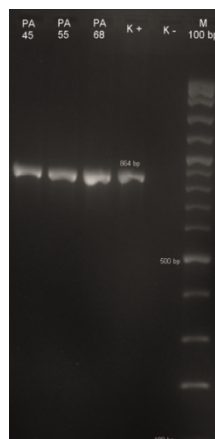
Pada penelitian ini terdapat 85 isolat klinis *P. aeruginosa* yang diisolasi dari beberapa spesimen berbeda antara lain pus (38,8%), sputum (35,3%), jaringan (7,1%), darah (5,9%), urin (3,5%), telinga.sekret(3,5%), bilasan bronkus (2,3%), dan yang paling rendah adalah bilasan lambung, cairan asites, dan cairan pleura (5,9%). Dari total 85 sampel, diambil 54 isolat (63,5%) dari pasien laki-laki dan 31 isolat (36,5%) diambil dari pasien perempuan (Tabel 1).

Tabel 1. Distribusi sampel

Variabel	n = 85	%
Jenis kelamin		
Laki-laki	54	63,5
Perempuan	31	36,5
Contoh		
Pus	33	38,8
Dahak	30	35,3
Jaringan	6	7,1
Darah	5	5,9
Air seni	3	3,5
Sekret telinga	3	3,5
Yang lain	5	5,9

Catatan: Yang lain: bilasan bronkus, bilasan lambung, cairan asites, cairan pleura

Metode PCR dilakukan untuk mengetahui gen β -laktamase dari *P.aeruginosa*isolat yaitu gen blaGES. Dari 85 isolat, gen blaGES menunjukkan hasil amplifikasi positif pada 3 isolat (3,5%) (Gambar 1).



Gambar 1. Deteksi PCR gen blaGES 864 bp untuk identifikasi ESBL .

Baris M menunjukkan pita untuk molekul standar dengan berat 100 bp, K+ adalah kontrol positif, dan K- adalah kontrol negatif. Baris 1-3 adalah sampel *Pseudomonas* isolat *Pseudomonas aeruginosa*. Kode sampel PA45, PA55, dan PA68 menunjukkan hasil positif pita amplifikasi untuk gen blaGES pada isolat *P. aeruginosa*.

PEMBAHASAN

Pseudomonas aeruginosa diketahui memiliki resistensi intrinsik terhadap berbagai kelas antibiotik dan merupakan salah satu patogen nosokomial yang paling sering diisolasi, terutama pada pasien dengan imunitas rendah, perawatan intensif, dan penggunaan alat invasif. Secara global, peningkatan kemampuan resistensi *P. aeruginosa* telah menjadi tantangan besar dalam praktik klinis karena membatasi pilihan terapi yang efektif dan meningkatkan angka morbiditas serta mortalitas akibat infeksi bakteri ini (Tam *et al.*, 2010).

Resistensi *P. aeruginosa* terjadi melalui berbagai mekanisme yang kompleks dan saling berinteraksi. Mekanisme tersebut meliputi perubahan protein pengikat penisilin (penicillin-binding proteins/PBP), inaktivasi antibiotik melalui produksi enzim β -laktamase, perubahan jalur metabolisme sel, serta penurunan akumulasi antibiotik akibat peningkatan aktivitas pompa efluks dan penurunan permeabilitas membran luar. Kombinasi mekanisme ini menjadikan *P. aeruginosa* mampu bertahan terhadap berbagai antibiotik spektrum luas, termasuk β -laktam, aminoglikosida, dan kuinolon (Lin *et al.*, 2012).

Prevalensi *P. aeruginosa* yang membawa gen extended-spectrum β -laktamase (ESBL), termasuk gen blaGES, dilaporkan bervariasi secara signifikan antar negara dan wilayah. Dalam penelitian ini, ditemukan bahwa 3 dari 85 isolat klinis *P. aeruginosa* (3,5%) membawa gen blaGES. Temuan ini menunjukkan prevalensi yang relatif rendah. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lin *et al.* di Taiwan, yang melaporkan keberadaan gen blaGES pada 3 dari 57 isolat klinis *P. aeruginosa* (5,26%). Sebaliknya, penelitian di Brasil melaporkan prevalensi yang jauh lebih tinggi, yaitu 7 dari 25 isolat (28%), yang menunjukkan adanya perbedaan epidemiologi dan tekanan seleksi antibiotik antar wilayah.

Gen blaGES, yang mengode β -laktamase kelas A dengan aktivitas ESBL dan pada beberapa variannya memiliki aktivitas karbapenemase, telah dilaporkan di berbagai negara seperti Iran, Arab Saudi, dan Brasil. Variasi prevalensi ini kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan penggunaan antibiotik, kebijakan pengendalian infeksi rumah sakit, serta mobilitas gen resistensi yang dimediasi oleh elemen genetik bergerak seperti integron dan plasmid (Ahmed dan Asghar, 2017).

Rendahnya prevalensi gen blaGES dalam penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme resistensi β -laktam pada isolat *P. aeruginosa* di wilayah Makassar kemungkinan tidak hanya bergantung pada produksi ESBL tipe GES. Mekanisme lain, seperti peningkatan aktivitas pompa efluks, perubahan porin membran luar, serta mutasi gen target antibiotik, diduga berperan penting dalam pola resistensi yang ditemukan. Hal ini diperkuat oleh hasil uji sensitivitas antibiotik yang menunjukkan variasi tingkat resistensi meskipun gen blaGES hanya terdeteksi pada sebagian kecil isolat.

Deteksi gen blaGES pada beberapa isolat klinis dalam penelitian ini memiliki implikasi epidemiologis yang penting. Temuan ini menegaskan bahwa meskipun prevalensinya rendah, gen resistensi ESBL minor seperti blaGES telah beredar di Sulawesi Selatan, Indonesia. Dengan demikian, hasil penelitian ini memberikan kontribusi data awal yang penting dalam pemetaan distribusi gen blaGES secara global serta menjadi dasar untuk pengawasan berkelanjutan terhadap penyebaran gen resistensi antibiotik pada *P. aeruginosa* di Indonesia.

KESIMPULAN

Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang melaporkan keberadaan gen blaGES pada isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* di Sulawesi Selatan, Indonesia. Hasil positif gen blaGES penyandi ESBL pada *Pseudomonas aeruginosa* memerlukan kajian komprehensif lebih lanjut untuk mengkorelasikan gen penyandi ESBL dengan pola sensitivitas antibiotik untuk mencegah penyebaran infeksi oleh organisme tersebut.

SARAN

Hasil positif gen blaGES penyandi ESBL pada *Pseudomonas aeruginosa* memerlukan kajian komprehensif lebih lanjut untuk mengkorelasikan gen penyandi ESBL dengan pola sensitivitas antibiotik untuk mencegah penyebaran infeksi oleh organisme tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan Pusat Penelitian Medis Universitas Hasanuddin (HUM-RC) RS Universitas Hasanuddin atas bantuan dan kerjasamanya selama dilakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, O.B. dan Asghar, A.H. (2017) 'Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* expressing blaGES and blaPER genes in two different hospitals', *African Journal of Biotechnology*, 16(21), hlm. 1197–1202. doi:10.5897/AJB2017.16027.
- Azimi, S., Kafil, H.S., Baghi, H.B., Shokrian, S., Najaf, K. dan Asgharzadeh, M. (2016) 'Presence of exoY, exoS, exoU and exoT genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates', *GMS Hygiene and Infection Control*, 11, hlm. 2–6. doi:10.3205/dgkh000264.
- Bavasheh, N. dan Karmostaji, A. (2017) 'Antibiotic resistance pattern and evaluation of blaOXA-10, blaPER-1, blaVEB and blaSHV genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Infectious Epidemiology and Medicine*, 3(1), hlm. 1–5. doi:10.18869/modares.iem.3.1.1.
- Do Toka, W., Sjahril, R. dan Hamid, F. (2021) 'Antibiotic susceptibility pattern in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Nusantara Medical Science Journal*, hlm. 66–73.
- Farshadzadeh, Z., Khosravi, A.D., Alavi, S.M., Parhizgari, N. dan Hoveizavi, H. (2014) 'Dissemination of extended-spectrum β -lactamase genes blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients', *Burns*, 40(8), hlm. 1575–1580. doi:10.1016/j.burns.2014.02.008.
- Lin, S.P., Liu, M.F., Lin, C.F. dan Shi, Z.Y. (2012) 'Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45, hlm. 200–207. doi:10.1016/j.jmii.2011.11.015.
- Olowe, O.A. dan Adefioye, S. (2014) 'Understanding extended-spectrum beta-lactamases in clinical settings', *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3, hlm. 51–61.
- Pellegrino, F.L.P.C., Santos, K.R.N., Riley, L.W. dan Moreira, B.M. (2006) 'blaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil', *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10(4), hlm. 251–253. doi:10.1590/S1413-86702006000400007.
- Pobiega, M., Wojkowska-Mach, J., Maciąg, J., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D. dan Pomorska-Wesołowska, M. (2014) 'Virulence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with urinary tract infections', *Chemotherapy*, 60(4), hlm. 253–260. doi:10.1159/000376569.
- Shankar, P.R. dan Balasubramaniam, R. (2014) 'Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014', *Australasian Medical Journal*, 7(5), hlm. 237.
- Tam, V.H., Chang, K.T., Abdelraouf, K., Brioso, C.G., Ameka, M. dan McCaskey, L.A. (2010) 'Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), hlm. 1160–1164. doi:10.1128/AAC.01446-09.
- Tavajjohi, Z., Moniri, R. dan Zarrabi, M. (2013) 'Detection of GES-2, a class A β -lactamase, produced by *Pseudomonas aeruginosa* in educational hospitals', *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(10). doi:10.5812/jjm.8166.
- Laudy, A.E., Róg, P., Smolińska-Król, K., Ćmiel, M., Słoczyńska, A. dan Patzer, J. (2017) 'Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland', *PLoS ONE*, 12(6), e0180121. doi:10.1371/journal.pone.0180121.