

## **Deteksi Gen Resisten Kloramfenikol (*cat*) pada Isolat Klinik *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***

### ***Detection of Chloramphenicol Resistance Genes (*cat*) in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Using The Polymerase Chain Reaction Method***

Didik Wahyudi<sup>1\*</sup>, Yusianti Silviani<sup>1</sup>, Ardy Prian Nirwana<sup>1</sup>, dan Dewi Saroh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia

#### **Abstrak**

*Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* adalah patogen oportunistik dari kelompok bakteri gram negatif yang menyebabkan infeksi pada tubuh manusia. Kedua spesies tersebut sering ditemukan telah resisten terhadap beberapa antibiotik. Kloramfenikol merupakan antibiotik yang sering digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri tersebut, salah satu gen pengendali resistensi kloramfenikol adalah gen *cat*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen resistensi kloramfenikol (*cat*) pada isolat klinik *P. aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Bakteri diisolasi dari kasus infeksi di Rumah Sakit. Kemudian dilakukan identifikasi dengan metode uji biokimia, isolasi DNA, kemudian diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction*, dengan menggunakan dua pasang primer spesifik untuk kedua bakteri tersebut, dilanjutkan visualisasi hasil PCR dengan menggunakan elektroforesis. Hasil uji menunjukkan bahwa semua isolat *P. aeruginosa* terdeteksi adanya gen *cat* (100%), sedangkan *E. coli* terdeteksi gen *cat* sebesar 71,4%.

**Kata Kunci:** gen *cat*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, PCR

#### **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are opportunistic pathogens from the gram-negative bacteria group that cause infections in the human body. Both species are often found to be resistant to several antibiotics. Chloramphenicol is an antibiotic that is often used to treat bacterial infections. One of the genes controlling chloramphenicol resistance is the *cat* gene. This study aims to detect the presence of chloramphenicol (*cat*) resistance genes in clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Escherichia coli*. Bacteria isolated from infection cases in hospitals. Then identification was carried out using biochemical test method, DNA isolation, then amplification using the Polymerase Chain Reaction method, using two pairs of specific primers for the two bacteria species, followed by visualization of the PCR results using electrophoresis. The test results showed that all *P. aeruginosa* isolates detected the *cat* gene (100%), while *E. coli* had the *cat* gene detected at 71.4%.

**Keywords:** gen *cat*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, PCR

---

#### **\* Corresponding author:**

Didik Wahyudi

Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional  
Jl Raya Solo – Baki, Kwarasan, Grogol, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia

Email: didikww@gmail.com

## Pendahuluan

*Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen oportunistik penyebab utama infeksi di beberapa bagian tubuh seperti pneumonia, infeksi saluran kemih (ISK), infeksi pada berbagai organ, dan bakteremia (Karungamye *et al.*, 2023), terutama pada pasien yang mengalami penurunan sistem imun (Abed *et al.*, 2023). *P. aeruginosa* memiliki sifat yang sangat unik, pada kondisi tertentu membentuk biofilm pada jaringan tubuh, berkoloni membentuk *micro-niche* yang kompleks dan spesifik (Ridyard *et al.*, 2023). Kondisi tersebut menyebabkan bakteri mengalami perubahan karakter, sehingga mengakibatkan infeksi menjadi sulit untuk diobati (Abed *et al.*, 2023; Wahyudi *et al.*, 2019). Beberapa kasus infeksi klinis ditemukan strain *E. coli* yang telah menjadi resisten terhadap beberapa antibiotik (Rotinsulu *et al.*, 2022; Sserwadda *et al.*, 2023).

Salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengatasi infeksi *P. aeruginosa* dan *E. coli* adalah kloramfenikol (Yan *et al.*, 2022). Antibiotik ini bersifat bakteriostatik yang menghambat sintesis protein dengan mengganggu pembentukan kompleks asam amino-asil-tRNA dengan ribosom subunit 50S (Cynthia *et al.*, 2022; Farizqi *et al.*, 2023). Asosiasi peptidil transferase dengan asam amino tidak terjadi sehingga penambahan gugus asam amino yang baru pada proses pemanjangan rantai peptida akan terganggu (Wira *et al.*, 2023). Wahyudi *et al.* (2019), menyatakan bahwa kasus resistensi *P. aeruginosa* dan *E. coli* terhadap kloramfenikol semakin menunjukkan kecenderungan peningkatan, sehingga penggunaannya untuk mengatasi infeksi bakteri tersebut perlu dipertimbangkan. Antibiotik kloramfenikol berikatan dengan subunit 50S dari ribosom dan akan mempengaruhi pengikatan asam amino yang baru pada rantai peptida karena kloramfenikol menghambat peptidil transferase. Resistensi bakteri terhadap kloramfenikol disebabkan bakteri menghasilkan enzim kloramfenikol asetiltransferase yang dapat merusak aktivitas obat. Pembentukan enzim ini berada di bawah kontrol plasmid (Cynthia *et al.*, 2022; Novelni *et al.*, 2023).

*P. aeruginosa* dan *E. coli* diketahui mampu menyintesis enzim kloramfenikol asetiltransferase yang mengatalisis proses asetilasi pada gugus hidroksil dalam struktur kloramfenikol, dengan menggunakan asetil koenzim A sebagai donor gugus asetil (Shams *et al.*, 2019). Proses ini menghasilkan derivat asetoksi kloramfenikol yang tidak mampu berikatan dengan ribosom bakteri (Yamamoto *et al.*, 2022). Enzim tersebut dikode oleh gen *cat* dengan ukuran target yang diamplifikasi sebesar 860bp dalam suatu plasmid yang dapat dipindahkan antar bakteri melalui proses konjugasi. Deteksi gen *cat* dalam DNA *P. aeruginosa* dapat dilakukan melalui metode molekuler seperti metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Leong *et al.*, 2022; Milanda *et al.*, 2014; Shams *et al.*, 2019). Deteksi dilakukan dengan mengamplifikasi gen *cat* secara *in vitro* pada konsentrasi DNA yang sangat kecil (Poirel *et al.*, 2022; Rotinsulu *et al.*, 2022; Wibisono *et al.*, 2022). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *cat* dari beberapa isolat klinik *P. aeruginosa* dan *E. coli* dengan metode PCR.

## Materi dan Metode

### Alat dan Bahan Penelitian.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya mikroskop, *autoclave*, inkubator, *collection tube*, centrifuge, 1,5 ml *microcentrifuge tube*, waterbath, *chamber elektroforesis*, gel agarose, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Thermal Cycler Machine* T100, *Biorad UV - Transilluminator Gel Doc*

Isolat bakteri *P.* dan *E. coli*, Antibiotik kloramfenikol 500mg, Luria-Bertani (LB), *Acid Isopropanol* 5 %, *crystal violet* 1%, safranin, *Media Brain Heart Infusion* (BHI), *Media Mac Conkey* (MC). *Media Uji Biokimia: Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), Urea, Citrat, *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), *Phenyl Alanine Deaminase* (PAD). *Media Glukosa*, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa, Reagen *Erlich*, *Methyl Red* (MR), Ferri Klorida (FeCl<sub>3</sub>) 10 %, Kalium Hidroksida (KOH) 40%.

### Sampel Klinis

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* diisolasi dari sampel pasien

yang menderita penyakit infeksi di Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta, isolat *P. aeruginosa* yang berasal dari sampel urin, sputum dan pus, sedangkan isolat *E. coli* berasal dari sampel urin. Isolat kedua bakteri tersebut diidentifikasi dengan metode biokimia dengan menggunakan pewarnaan Gram, media penyubur (BHI), media selektif (MC), dan media uji biokimia.

#### **Isolasi dan Identifikasi Bakteri.**

Isolat klinik *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* dilakukan identifikasi dengan Pengecatan Gram dan Uji Biokimia. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media BHI diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Suspensi bakteri diinokulasikan ke media *Mac Conkey* (diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam). Koloni pada media *Mac Conkey* diamati, kemudian dilakukan pewarnaan Gram, dan diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui karakteristik dan morfologi selnya, Koloni tersangka tersebut diinokulasikan ke media uji biokimia, yaitu: TSIA (*Tiple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfid Indol Motility*), Urea, Citrat, Metilen Red (MR), Voges Proskauer (VP), *Phenyl Alanin Deaminase* (PAD), dan Media Fermentasi Karbohidrat (Chiuman *et al.*, 2023).

#### **Isolasi DNA *Pseudomonasa aeruginosa* dan *Escherichia coli***

Isolat *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* ditumbuhkan dalam 20 mL medium LB dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Lima mililiter kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dan pelet yang didapatkan dicuci dengan buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan dan waktu yang sama. Pelet yang telah dicuci tersebut diresuspensi dengan 400 µL larutan *buffer* (NaCl 75 mM; EDTA 25mM; Tris 20mM; pH 7,5), ditambahkan sebanyak 50 µL lisozim dengan konsentrasi 100 µg mL<sup>-1</sup>, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Suspensi pelet yang diperoleh ditambah dengan 10 µL proteinase-K, diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi suspensi pelet

ditambah 167 µL NaCl, diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam (Wahyudi *et al.*, 2019)

Kloroform dingin (400 µL) ditambahkan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, disentrifugasi pada 13.000rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat dituangkan ke dalam tabung sentrifuge baru dan ditambah 200 µL kloroform, dihomogenisasi (*vortex*), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan isopropanol (perbandingan 1 : 1), selanjutnya diinversikan dan diinkubasi pada suhu -20°C semalam. Suspensi DNA disentrifugasi dan dicuci dengan etanol 70%, disentrifugasi selama 30 detik kemudian etanol dibuang. Pelet yang diperoleh dikeringanginkan kemudian diresuspensikan dengan 30 µL buffer TE. DNA divisualisasi melalui elektroforesis gel agarose untuk melihat DNA yang diperoleh (Leong *et al.*, 2022; Tambat *et al.*, 2022).

#### **Amplifikasi gen *cat* dengan PCR**

Primer yang digunakan dalam penelitian adalah primer untuk gen *cat* adalah sebagai berikut, untuk isolat *Pseudomonas aeruginosa* digunakan *forward primer cat* (5'-GGTCCAACCCATTGCTTTAC-3') dan *reverse primer reverse cat* (5'-CACGGA AAGAAATCACAAC-3'), dengan produk ampikon yang dihasilkan sebesar 202bp (NCBI, 2023). Untuk isolat *Escherichia coli* digunakan *forward primer* : TTCTTGCCCGCCTGATGAAT dan *reverse primer*: ACCGTAACACGCCACATCTT dengan produk ampikon yang dihasilkan sebesar 647bp (ncbi, 2023). DNA hasil isolasi 2 µL dengan konsentrasi 20 pmolµL<sup>-1</sup>, primer 1 µL dengan konsentrasi 10 pmolµL<sup>-1</sup>, *Gotag green kit* 12,5 µL, dan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 8,5 µL dimasukkan ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR, pre-denaturasi 94 °C, 2 menit; tahap denaturasi 92°C, 30 detik; tahap annealing 55 °C, 30 detik; tahap elongasi 72 °C selama 1 menit (30 siklus). Selanjutnya *post PCR* pada suhu 75 °C selama 20 menit dan tahap *stop PCR* pada suhu 4 °C (Milanda *et al.*, 2014; Wahyudi *et al.*, 2019).

Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis *running*

gel agarose dan visualisasi DNA. Sebanyak 1  $\mu$ L loading buffer diteteskan dua kali di atas kertas parafin, sebanyak  $\pm$  5  $\mu$ L DNA diteteskan di atas loading buffer, dihomogenasikan, selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran gel. Ke dalam sumuran 1 dimasukkan *marker (ladder)* dan sampel dimasukkan ke dalam sumuran berikutnya, kemudian *running* pada alat elektroforesis (Yan *et al.*, 2022).

## Hasil

### Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.

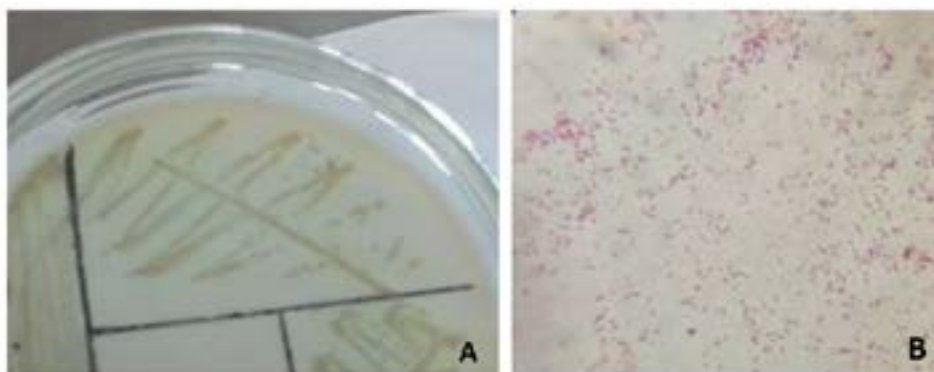
Hasil identifikasi dan karakterisasi fenetik 6 isolat klinik (Pa.01, Pa.02, Pa.03, Pa.04, Pa.05 dan Pa.06) yang berasal dari berbagai sampel klinik pasien di Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta. *Pseudomonas aeruginosa* terlihat memiliki karakteristik koloni sirkuler mengkilap, berbentuk batang gram negatif (Gambar 1). Hasil uji biokimia *P. aeruginosa* dari 6 isolat tersebut semua sama meskipun diisolasi dari berbagai kasus infeksi dan jenis sampel yang berbeda-beda,

yaitu: sampel urin (Pa.01 dan Pa.02), sampel sputum (Pa.03 dan Pa.04), pus (Pa.05 dan Pa.06) (Tabel 1).

Peneliti berhasil mengisolasi tujuh isolat *Escherichia coli* yang berasal dari sampel urin pasien penderita infeksi saluran kemih, kemudian diberi kode isolat: kode Ec01, Ec02, Ec03, Ec04, Ec05, Ec06, dan Ec07. Struktur dan susunan sel dilihat dengan mikroskopis terlihat sel berbentuk batang, cukup bervariasi panjangnya, dengan susunan tersebar dan berwarna merah (Gram negatif) (Gambar 2). Hasil uji biokimia *E. coli* dari sampel urin memiliki karakteristik pertumbuhan yang hampir sama ketika ditumbuhkan pada media TSIA, SIM, Urea, sitrat, PAD, MR, VP, glukosa, maltosa, manitol, dan laktosa (Tabel 2).

### Isolasi DNA *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*

Hasil isolasi DNA isolat *P. aeruginosa* dan *E. coli* terlihat adanya pita pada hasil visualisasi dengan elektroforesis, hal tersebut menunjukkan bahwa semua DNA bakteri

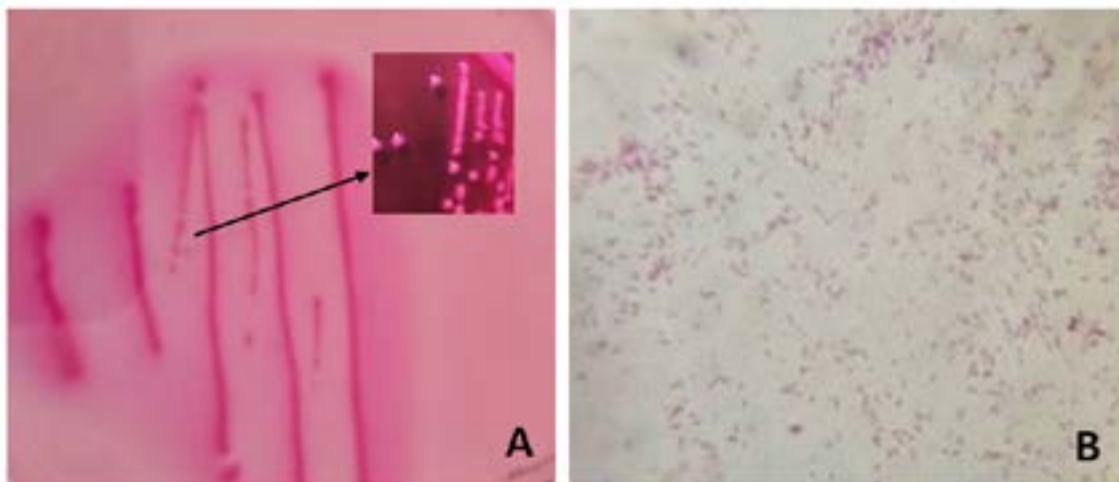


Gambar 1. Gambaran koloni isolat klinik *P. aeruginosa* yang diisolasi dari sampel sputum pada media *trypticase agar* (A). Gambaran mikroskopis *P. aeruginosa* dengan pengecatan Gram (B).

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia Isolat *Pseudomonas aeruginosa*

Kode	TSIA			SIM			Urea	Citrat	MR	VP	Fermantasi Karbohidrat			
	ferm	H <sub>2</sub> S	Gas	Indol	H <sub>2</sub> S	Motil					Glu	Man	Mal	Lakt
Pa.01	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Pa.02	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Pa.03	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Pa.04	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Pa.05	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Pa.06	Alk/Alk	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Ket: ferm= fermentasi; Alk=Alkali; MR= Methyl Red; VP= Vogen Proskauer; Glu= Glukosa; Man= Manitol; Mal= Maltosa, Lakt= laktosa.



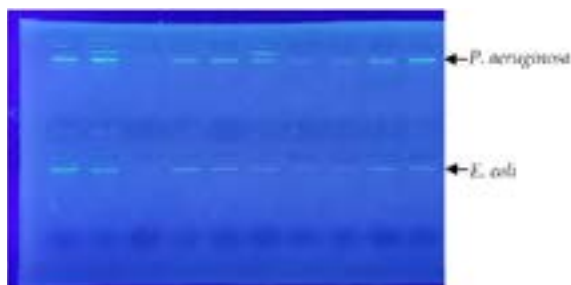
Gambar. 2. Gambaran koloni *E. coli* dari sample urin. A. Koloni pada media *Mac Conkey*; B. Gambaran mikroskopis dengan pewarnaan Gram.

Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat *Escherichia coli*.

Kode	TSIA			SIM		Urea	Citrat	MR	VP	Fermantasi Karbohidrat				
	ferm	H <sub>2</sub> S	Gas	Indol	H <sub>2</sub> S					Motil	Glu	Man	Mal	Lakt
Ec.01	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.02	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.03	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.04	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.05	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.06	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ec.07	Acid/Acid	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+

Ket: ferm= fermentasi; MR= Methyl Red; VP= Vogen Proskauer; Glu= Glukosa; Man= Manitol; Mal= Maltosa, Lakt+ laktosa.

dari isolat-isolat *P. aeruginosa* dan *E. coli* telah terisolasi dengan baik. Perlakuan ini dilakukan sebagai bentuk uji kualitatif terhadap proses ekstraksi DNA bakteri, DNA berhasil diisolasi dengan penanda adanya pita setelah dilakukan elektroforesis (Gambar 3).

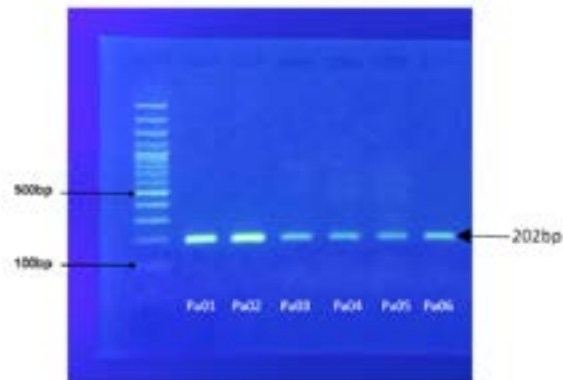


Gambar 3. Hasil isolasi DNA isolat *Pseudomonas aeruginosa* (atas) dan *Escherichia coli* (bawah). Sebagai uji kualitatif keberhasilan ekstraksi DNA dengan pananda munculnya pita setelah dilakukan elektroforesis.

**Deteksi Gen *cat* *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli***

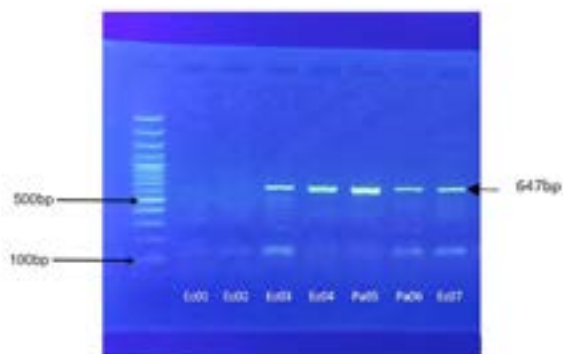
Hasil amplifikasi gen *cat* pada *P. aeruginosa* menghasilkan amplicon sebesar 202bp (Gambar 4.). Hasil identifikasi gen *cat* ini telah melalui beberapa uji pendahuluan sebelumnya yang berkaitan dengan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen tersebut baik pada *P. aeruginosa* dan *E. coli*. Kedua bakteri tersebut tidak bisa diampifikasi dengan menggunakan primer yang sama, sehingga harus menggunakan primer sendiri-sendiri. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan bakteri (*E. coli* dan *P. aeruginosa*) yang telah diketahui resisten terhadap kloramfenikol, dan kontrol negatifnya menggunakan bakteri masih sensitif terhadap kloramfenikol.

Visualisasi pada elektroforesis gen *cat* pada beberapa isolate *E. coli* menunjukkan bahwa isolat Ec01 dan Ec 02 gen *cat* tidak



Gambar 4. Visualisasi produk PCR gen *cat* pada isolat klinik *Pseudomonas aeruginosa* dengan elektroforesis, (ukuran marker= 100bp)

tervisualisasi, sedangkan pada isolat Ec03, Ec04, Ec05, Ec06 dan Ec07 tervisualisasi dengan baik. Berdasarkan hasil tersebut maka isolat Ec 01 dan Ec02 masih sensitif terhadap antibiotik kloranfenikol. Hasil amplifikasi gen *cat* pada *E. coli* menghasilkan ampikon sebesar 647 bp (Gambar 5)



Gambar 5. Visualisasi produk PCR gen *cat* pada isolat klinik *Escherichia coli* dengan elektroforesis, ukuran marker = 100bp.

## Pembahasan

Enam isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang ditemukan memiliki karakteristik koloni yang sama, yaitu memiliki pigmen pyocyanin (hijau kebiruan) dengan koloni berlendir dan bentuk tidak beraturan (Gambar 1.A), gambaran mikroskopis terlihat sel berwarna merah (Gram negatif), tersebar, dengan ukuran panjang yang bervariasi (Gambar 1.B). Demikian juga pada karakteristik uji biokimia seluruh isolat Pa01 sampai dengan Pa06 sama, yaitu tidak memfermentasikan semua karbohidrat, juga terlihat pada hasil uji biokimia pada media TSIA, alkali/alkali, tidak memfermentasikan glukosa dan laktosa.

*P. aeruginosa* merupakan proteobacteria, yaitu mendegradasi dan menghidrolisis protein untuk menghasilkan energi dan untuk pertumbuhannya, dari seluruh media uji biokimia hanya citrat dan motil yang positif, *P. aeruginosa* mampu memfermentasikan citrat dengan enzim citrat permease, dan bakteri ini merupakan bakteri yang memiliki flagel sehingga terlihat pada media SIM berkas pertumbuhan menyebar pada sekita tusukan dengan jarum ose (Seftiwan *et al.*, 2023).

Tujuh isolat klinik *Escherichia coli* dari sampel Ec01 sampai dengan Ec07 juga memiliki karakteristik yang sama ketika diinokulaikan pada media *Mac Conkey*, Koloni *E. coli* memiliki ukuran 1 – 2 mm, bulat berwarna merah (bakteri memfermentasikan laktosa), media *Mac Conkey* mengandung indikator phenol red, jika dalam suasana asam akan berwarna merah. *E. coli* pada media ini akan memfermentasikan laktosa sehingga merubah laktosa menjadi asam organik, khususnya asam laktat yang akan menyebabkan pH media menjadi asam, sehingga media menjadi merah muda, timbul (menonjol), memiliki inti, termasuk tipe koloni M (muroid) (Gambar 2A). Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa *E. coli* yang diisolasi dari kasus infeksi pada saluran kemih dari pasien dengan beraneka ragam tingkat keparahan menunjukkan karakteristik yang sama, semua isolat *E. coli* memfermentasikan media glukosa, manitol, maltosa dan laktosa, hal ini bisa dilihat dari warna media yang semula merah karena adanya indikator yang ditambahkan (*karbol fuksin*) setelah inkubasi berubah menjadi kuning, ini menjadi indikator adanya pertumbuhan bakteri pada media menyebabkan suasana menjadi asam, dan menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning (Usnaini, 2017).

Hasil amplifikasi gen *cat* menunjukkan bahwa gen ditemukan di semua isolat *P. aeruginosa* yang berasal dari urin, sputum dan pus. Gen ini menjadi penanda adanya resistensi bakteri terhadap antibiotik kloramfenikol. *P. aeruginosa* mampu mensintesis enzim yang mengkatalisis proses asetilasi pada gugus hidroksil dalam struktur kloramfenikol, dengan menggunakan asetil koenzim A sebagai donor gugus asetil (Leong

*et al.*, 2022; Milanda *et al.*, 2014). 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 (Cynthia *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil penelitian Feßler *et al.*, (2022) dan Wahyudi *et al.*, (2019) menyatakan bahwa *P. aeruginosa* telah memiliki intrinsik resisten terhadap antibiotik kloramfenikol, baik pada sel planktonik dan sel biofilm. Mekanisme resistensi bakteri terhadap kloramfenikol melalui penghambatan jalur asetilasi melalui kloramfenikol asetiltransferase (Milanda *et al.*, 2014). Enzim tersebut dikendalikan oleh gen *cat* dan gen tersebut mudah ditransferkan dari satu bakteri ke bakteri yang lain, karena terikat di dalam plasmid. Menurut Bale *et al.*, (2023) gen *cat* ada 3 varian, yaitu *catA*, *catB*, dan *catC*. Diketahui gen *catA* memberi kontribusi yang signifikan terhadap resistensi terhadap kloramfenikol dan asam fusidat, *catB* atau asetiltransferase xenobiotik berperan dalam mempercepat kejadian resistensi, sedangkan *catC* secara detail belum diketahui peran spesifiknya (Karungamy *et al.*, 2023).

Beberapa penelitian Abed *et al.* (2023); Bale *et al.*, (2023); Das *et al.*, (2023); Ridyard *et al.*, (2023) menyatakan bahwa antibiotik kloramfenikol masih bisa menghambat *Escherichia coli*, dengan penghambatan yang bervariasi, tingkat resisten berkisar antara 15 sampai 35%, hal ini juga terlihat pada penelitian ini, dari tujuh isolat *E. coli* ditemukan ada lima isolat yang resisten terhadap kloramfenikol, dan ada dua isolat yang tidak terdeteksi adanya gen *cat*, yang artinya ada dua isolat yang masih sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol. Penelitian ini menggunakan sepasang primer untuk amplifikasinya dengan panjang ampikon sebesar 647bp, cukup spesifik dan bisa dipakai sebagai penanda keberadaan gen *cat* ini pada spesies *E. coli*. Penelitian menunjukkan bahwa untuk mengamplifikasi gen *cat* pada *P. aeruginosa* dan *E. coli* tidak bisa menggunakan primer yang sama, hal ini disebabkan pada proses mutasi sehingga dalam rekombinasi

DNA, masing-masing bakteri merespon adanya mutasi tersebut dengan berbeda-beda karena dipengaruhi oleh beberapa faktor yang pada akhirnya ketika gen *cat* berikatan dengan plasmid bakteri terjadi modifikasi yang selanjutnya menyebabkan urutan basa nitrogen penyertanya berbeda (Taufik, 2022). Mekanisme kloramfenikol dalam menghambat *E. coli* masih memiliki mekanisme yang sama dengan *P. aeruginosa*. Kejadian resistensi kloramfenikol pada *E. coli* bisa melalui horizontal transfer gen, melalui mutasi, dan rekombinasi genetik, yang akhirnya memunculkan generasi baru yang resisten terhadap kloramfenikol (Yan *et al.*, 2022). Mekanisme resistensi kloramfenikol juga bisa melalui sistem *vaccum pump*, penghambatan permeabilitas membran, mutasi gen, dan inaktivasi oleh fosfotransferase (Bale *et al.*, 2023; Feßler *et al.*, 2022).

Meskipun jumlah sampel dalam penelitian ini kecil tetapi cukup mewakili dari beberapa sampel klinis, gen *cat* bisa terdeteksi pada bakteri *P. aeruginosa* dan *E. coli*. Beberapa bakteri yang tergabung dalam familia Enterobacteriaceae diketahui bisa memiliki karakteristik gen *cat* yang sama, sehingga dari tinjauan molekuler penelitian ini bisa digunakan sebagai acuan untuk menemukan similaritas sekuens DNA pada tingkat familia. Sejalan dengan Milanda *et al.*, (2014) bahwa gen *cat* ini bisa digunakan sebagai penanda resistensi kloramfenikol pada *P. aeruginosa*. Melengkapi penelitian tersebut, maka hasil penelitian ini juga memberi informasi ilmiah yang baru bahwa gen *cat* ini juga bisa digunakan sebagai penanda resisten kloramfenikol pada *E. coli*. Hal lain yang menjadi temuan baru dari hasil penelitian ini adalah bahwa primer yang digunakan pada penelitian ini, baik primer untuk amplifikasi gen *cat* pada *P. aeruginosa* dan *E. coli* merupakan primer spesifik, yang belum pernah digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Karungamy *et al.*, (2023) menyebutkan bahwa tingkat resistensi kloramfenikol pada *P. aeruginosa* lebih tinggi jika dibandingkan dengan *E. coli* yang diisolasi dari sampel klinik, hal ini menguatkan hasil penelitian ini bahwa

keberhasilan amplifikasi gen *cat* pada *P. aeruginosa* lebih tinggi jika dibandingkan dengan *E. coli*. Hasil penelitian ini bisa membuka jalan untuk penelitian-penelitian selanjutnya mengenai identifikasi gen dan spesies suatu bakteri. Kejadian resisten kloramfenikol pada bakteri perlu dikaji lebih lanjut, terutama keterlibatan gen-gen yang lain. Hal ini dikarenakan, kejadian resistensi bakteri terhadap obat antibiotik biasanya melibatkan lebih dari satu gen yang berkaitan satu dengan yang lain.

### Kesimpulan

Semua isolat koinis *Pseudomonas aeruginosa* terdeteksi adanya gen *cat* (100%), sedangkan *Escherichia coli* terdeteksi gen *cat* sebesar 71,4%. Gen *cat* pada *P. aeruginosa* teramplifikasi sebesar 202bp, sedangkan *E. coli* teramplifikasi sebesar 647bp. *E. coli* memiliki tingkat keberhasilannya amplifikasinya lebih rendah dibandingkan *P. aeruginosa* hal ini berkaitan dengan tingkat resistensi *E. coli* lebih rendah dibandingkan dengan *P. aeruginosa*.

### Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang telah mendukung dan membiayai penelitian ini dengan hibah internal LPPM 2022/2023.

### Daftar Pustaka

- Abed, Z., Ali, M. M., & Abed, S. N. (2023). *Review Article Antibiotic Resistance in Escherichia Coli*. *Karbala Journal of Medicine* 16(1): 2613–2620.
- Alghamdi, S. (2022). Isolation and identification of the oral bacteria and their characterization for bacteriocin production in the oral cavity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, [online] 29(1): 318–323. Available from: doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.096 [Accessed 29th November 2023].
- Bale, B. I., Elebesunu, E. E., Manikavasagar, P., Agwuna, F. O., Ogunkola, I. O., Sow, A. U., & Lucero-Prisno, D. E. (2023). Antibiotic resistance in ocular bacterial infections: an integrative review of ophthalmic chloramphenicol. *Tropical Medicine and Health*, [online] 51(1). Available from: doi.org/10.1186/s41182-023-00496-x [Accessed 12th December 2023].
- Chiuman, L., Sherlyn, S., Aritonang, N. S., Rudy, R., & Suhartomi, S. (2023). In Vitro Study of Antibacterial Activity of Snake Fruit Extract against Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) *Escherichia coli*. *Jurnal Aisyah : Jurnal Ilmu Kesehatan*, [online] 8(2): 715–720. Available from: doi.org/10.30604/jika.v8i2.1962 [Accessed 4th December 2023].
- Cynthia, E., Sitepu, R., & Destianita, C. (2022). Review Jurnal Kajian Resistensi Antibiotik Golongan Aminoglikosida Dan Golongan Tetrasiklin. *SAINSBERTEK Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*, 3(1):6–8.
- Das, S., Kabir, A., Chouhan, C. S., Shahid, M. A. H., Habib, T., Rahman, M., & Nazir, K. N. H. (2023). Domestic cats are potential reservoirs of multidrug-resistant human enteropathogenic *E. coli* strains in Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences*, [online] 30(10):103–1142. Available from: doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103786 [Accessed 14th November 2023].
- Farizqi, M. T. I., Effendi, M. H., Adikara, R. T. S., Yudaniayanti, I. S., Putra, G. D. S., Khairullah, A. R., Kurniawan, S. C., Silaen, O. S. M., Ramadhani, S., Millannia, S. K., Kaben, S. E., & Waruwu, Y. K. K. (2023). Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* genes isolated from cat rectal swabs at Surabaya Veterinary Hospital, Indonesia. *Veterinary World*, [online] 16(9):1917–1925. Available from: doi.org/10.14202/vetworld.2023.1917-1925 [Accessed 29th November 2023].
- Febler, A. T., Scholtzek, A. D., Schug, A. R., Kohn, B., Weingart, C., Hanke, D., Schink, A. K., Bethe, A., Lübke-Becker, A., & Schwarz, S. (2022). Antimicrobial and Biocide Resistance among Canine and Feline *Enterococcus faecalis*,



- Enterococcus faecium, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter baumannii Isolates from Diagnostic Submissions. *Antibiotics*, [online] 11(2):1–25. Available from: doi.org/10.3390/antibiotics11020152 [Accessed 24th November 2023].
- Karungamye, P., Rugaika, A., Mtei, K., & Machunda, R. (2023). Antibiotic Resistance Patterns of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Pseudomonas aeruginosa Isolated from Hospital Wastewater. *Applied Microbiology*, [online] 3(3):867–882. Available from: doi.org/10.3390/applmicrobiol3030060 [Accessed 21th November 2023].
- Leong, S. S., Lihan, S., & Toh, S. C. (2022). Prevalence of chloramphenicol-resistant gene in Escherichia coli from water sources in aquaculture farms and rivers of Kuching, Northwestern Borneo. *Fisheries and Aquatic Sciences*, [online] 25(4):202–213. Available from: doi.org/10.47853/FAS.2022.e19 [Accessed 5th December 2023].
- Milanda, T., Dewi, L., & Kusuma, S. (2014). Detection of Chloramphenicol Resistance Genes (cat) in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa with Polymerase Chain Reaction Method. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*, [online] 3(4):141–150. Available from: doi.org/10.15416/ijcp.2014.3.4.141 [Accessed 22th November 2023].
- Novelni, R., Sari, T. M., & Andila, F. (2023). Pola Bakteri dan Kepekaannya Terhadap Antibiotik pada Hasil Kultur Pasien di Intensive Care Unit RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2018. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, [online] 12(1):53–59. Available from: doi.org/10.51887/jpfi.v12i1.1758 [Accessed 18th November 2023].
- Poirel, L., De la Rosa, J. M. O., Sadek, M., & Nordmann, P. (2022). Impact of Acquired Broad-Spectrum  $\beta$ -lactamases on Susceptibility to Cefiderocol and Newly Developed b-Lactam/ b-Lactamase Inhibitor Combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] 66(4):76–87. Available from: doi.org/10.1128/aac.00039-22 [Accessed 19th November 2023].
- Ridyard, K. E., Elsayy, M., Matrasingh, D., Klein, D., Strehmel, J., Beaulieu, C., Wong, A., & Overhage, J. (2023). Synergy between Human Peptide LL-37 and Polymyxin B against Planktonic and Biofilm Cells of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, [online] 12(2):97–109. Available from: doi.org/10.3390/antibiotics12020389 [Accessed 20th November 2023].
- Rotinsulu, D. A., Afiff, U., & Septiriyanti, D. (2022). Resistansi *Escherichia coli* asal feses sapi di wilayah Bogor terhadap antimikrob. *ARSHI Veterinary Letters*, 6(4):75–76. Available from: doi.org/10.29244/avl.6.4.75-76 [Accessed 21th November 2023].
- Seftiwan Pratami Djasfar, & Pradika, Y. (2023). Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial (*Pseudomonas aeruginosa*) pada Lantai Intensive Care Unit (ICU). *Jurnal Medical Laboratory*, [online] 2(1):9–19. Available from: doi.org/10.57213/medlab.v2i1.135 [Accessed 26th November 2023].
- Shams, E., Nateghi, B., Eshaghiyan, A., & Behshood, P. (2019). TEM Gene Detection in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Samples. *Research in Molecular Medicine*, [online] 7(1):43–51. Available from: doi.org/10.18502/rmm.v7i1.5258 [Accessed 16th November 2023].
- Sserwadda, I., Kidenya, B. R., Kanyerezi, S., Akaro, I. L., Mkinze, B., Mshana, S. E., Hashim, S. O., Isoe, E., Seni, J., Joloba, M. L., & Mboowa, G. (2023). Unraveling virulence determinants in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from East Africa using whole-genome sequencing. *BMC Infectious Diseases*, [online] 23(1):1–10. Available from: doi.org/10.1186/s12879-023-08579-0 [Accessed 13th October 2023].
- Tambat, R., Mahey, N., Chandal, N., Verma, D. K., Jangra, M., Thakur, K. G., &

- Nandanwar, H. (2022). A Microbe-Derived Efflux Pump Inhibitor of the Resistance-Nodulation-Cell Division Protein Restores Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infectious Diseases*, [online] 8(2):255–270. Available from: doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00281 [Accessed 13th October 2023].
- Taufik, F. F. (2022). Ekspresi mRNA Gen TGF- $\beta$ , MCP-1 dan Soluble Protein TGF- $\beta$ , MCP-1 pada Mencit yang Diinduksi *Klebsiella pneumoniae* Setelah Pemberian Propolis [disertasi] Universitas Hasanudin, Makassar, Indonesia.
- Usnaini, R. (2017). Identifikasi *Escherichia coli* & *Pseudomonas aeruginosa* pada urin penderita infeksi saluran kemih di RSUD Dr. Moewardi Surakarta [thesis] Universitas Setiabudi, Surakarta, Indonesia.
- Wahyudi, D., Aman, A. T., Handayani, N. S. N., & Soetarto, E. S. (2019). Differences among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in their capability of forming biofilms and their susceptibility to antibiotics. *Biodiversitas*, [online] 20(5):1450–1456. Available from: doi.org/10.13057/biodiv/d200538 [Accessed 12th November 2023].
- Wibisono, B., Triani, V. M., Amanah, A., Jati, G., Immunologi, D., Tropis, P., Kedokteran, F., Swadaya, U., & Anatomi, D. (2022). Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri Patogen Pada Pasien Ulkus Diabetikum Di RSUD Waled Cirebon. *InaBHS (Indonesian Journal of Biomedicine and Health Science)*, [online] 1(1):97-108. Available from: www.jurnal.ugj.ac.id/index.php/InaBHS/article/view/7308 [Accessed 15th November 2023].
- Wira, I. G. A. A., Premandari, S., Abadi, M. F., & Arwidiana, D. P. (2023). Antibiotik pada Kultur Darah Bacteria Caused Bacteremia and Antibiotics Resistance Pattern in Blood. *Jurnal Insan Cendikia*, [online] 10(3):189-200. Available from: doi/10.35874/jic.v10i3.1239 [Accessed 5th November 2023].
- Yamamoto, K., Yamamoto, N., Ayukawa, S., Yasutake, Y., Ishiya, K., & Nakashima, N. (2022). Scaffold size-dependent effect on the enhanced uptake of antibiotics and other compounds by *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, [online] 12(1):1–12. Available: doi.org/10.1038/s41598-022-09635-6 [Accessed 18th November 2023].
- Yan, K. C., Patenall, B. L., Gardiner, J. E., Heylen, R. A., Thet, N., He, X. P., Sedgwick, A. C., James, T. D., & Jenkins, A. T. A. (2022). TCF-based fluorescent probe for monitoring superoxide anion produced in bacteria under chloramphenicol- and heat-induced stress. *Chemical Communications*, [online] 58(94):13103–13106. Available from: doi.org/10.1039/d2cc04662h [Accessed 15th November 2023].