

Deteksi Gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* pada *Pseudomonas aeruginosa* Isolat Klinis dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Detection of alg44, oprL and toxA Genes in Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolates using Polymerase Chain Reaction Method

Zana Zalianti¹, Umiyati Nur Hidayah¹, Tasya Ovtavianty Ferlita Dewi¹, & Didik Wahyudi^{1*}

¹Program Studi D-III Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional.

ABSTRAK

Gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* merupakan gen yang berperan dalam faktor virulensi pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dapat menyebabkan infeksi kronis pada manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan isolat klinis berupa sputum, urine dan pus dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. Penelitian ini dimulai dengan melakukan karakterisasi dari 6 sampel isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* yang berupa sputum, urine dan pus (masing-masing 2) melalui uji mikroskopis, makroskopis dan uji biokimia. Proses isolasi DNA bakteri menggunakan Presto Mini gDNA Bacteria Kit, hasil dari isolasi DNA dilakukan uji kualitatif elektroforesis gel agarosa dan uji kuantitatif dengan Spektrofotometer UV-Vis. Deteksi gen dilakukan pada enam sampel DNA *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* dengan primer spesifik. Hasil dari PCR menyatakan bahwa gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* terdeteksi pada semua isolat *Pseudomonas aeruginosa*.

Kata kunci: *alg44*, *oprL*, *toxA*, *Pseudomonas aeruginosa*, PCR.

ABSTRACT

The *alg44*, *oprL* and *toxA* genes are genes that play a role in virulence factors in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* which can cause chronic infections in humans. The purpose of this study was to detect the presence of *alg44*, *oprL* and *toxA* genes in *Pseudomonas aeruginosa* using clinical isolates in the form of sputum, urine and pus with the *Polymerase Chain Reaction* method. This study began by characterizing 6 clinical isolate samples of *Pseudomonas aeruginosa* in the form of sputum, urine and pus (2 each) through microscopic, macroscopic and biochemical tests. The process of bacterial DNA isolation using Presto Mini gDNA Bacteria Kit, the results of DNA isolation carried out qualitative agarose gel electrophoresis test and quantitative test with Spektrofotometer UV-Vis. Gene detection was performed on six DNA samples of *Pseudomonas aeruginosa* with *Polymerase Chain Reaction* method using specific primers. Results from PCR stated that *alg44*, *oprL* and *toxA* genes were detected in all isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *alg44*, *oprL*, *toxA*, *Pseudomonas aeruginosa*, 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 57552

Email: didik.wahyudi@stikesnas.ac.id

PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri aerob berbentuk batang dan memiliki sifat Gram negatif mampu menghasilkan enzim oksidase termasuk dalam kategori β -hemolisa dari family Pseudomonadaceae serta menjadi bakteri patogen oportunistik yang sering menyebabkan infeksi nosokomial (Djasfar & Pradika, 2023). Kemampuan beradaptasi dan ketahanan bakteri ini terhadap berbagai jenis antibiotik memungkinkan bakteri ini dapat bertahan hidup di berbagai jenis lingkungan (Hattab *et al.*, 2021). Bakteri ini mampu menyebabkan infeksi di seluruh tubuh, terutama pada penderita yang memiliki kekebalan tubuh rendah yang sedang dalam perawatan intensif, dikaterisasi atau menderita penyakit kronis (Ciamak, 2022).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang bisa hidup pada berbagai habitat, di tanah, air, dan mampu hidup pada berbedagi kondisi lingkungan (de Sousa *et al.*, 2025), memiliki kemampuan yang baik dalam beradaptasi terhadap lingkungan dan mampu menjadi penyebab infeksi pada beberapa bagian tubuh manusia dan hewan (Wahyudi *et al.*, 2019). Bakteri ini dapat merugikan inangnya dengan melepaskan faktor virulensi yang berkontribusi terhadap terjadinya infeksi dan menyebabkan penyakit (Qin *et al.*, 2022). *P. aeruginosa* memiliki beberapa faktor virulensi yaitu, alginat, lipoprotein dan eksotoksin A (Khosravi *et al.*, 2016). *P. aeruginosa* ditemukan telah resisten terhadap beberapa jenis antibiotik, antara lain Carbapenem sebesar 13.45%, meropenem sebesar 19% (Syarif *et al.*, 2024), Ciprofloxacin sebesar 25%, Gentamisin sebesar 28%, dan Oztreonam sebesar 27% (Wahyudi *et al.*, 2019). Salah satu faktor yang

menjadi penyebab *P. aeruginosa* resisten adalah karena kemampuannya membentuk biofilm dalam jaringan, adanya *horizontal transfer gene*, dan *intrinsic* resisten. Beberapa senyawa yang menjadi komponen utama pembentukan biofilm adalah alginat, dan protein Opr yang memiliki kemampuan untuk transport efflux antibiotik (Gawad & Gharbi, 2022)

Alginat merupakan lapisan ekso polisakarida berlendir yang membungkus bakteri *P. aeruginosa* yang dapat mempermudah bakteri berkolonisasi dan melindungi diri dari antibiotik. Gen yang berperan penting dalam proses biosintesis alginat *P. aeruginosa* adalah gen *alg44* (Zhou *et al.*, 2017, Wahyudi *et al.*, 2019). Gen *oprL* yang mengkode lipoprotein menjadi satu faktor virulensi dan menjadi bagian dari sistem transpor efflux antibiotik. Gen *oprL* bertanggung jawab atas sintesis protein membran luar (Gawad & Gharbi, 2022). Eksotoksin A dianggap sebagai salah satu faktor virulensi ekstraseluler paling kuat pada *P. aeruginosa*, faktor virulensi ini dapat menghambat sintesis protein (Auda *et al.*, 2015). Gen *toxA* merupakan gen pengkode dari eksotoksin A yang menyebabkan nekrosis jaringan karena menghambat sintesis protein (Chand *et al.*, 2022)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida secara *in vitro*. PCR merupakan salah satu metode yang sering digunakan dalam mendeteksi gen pada mikroorganisme. Terdapat beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai deteksi gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* yang merupakan faktor virulensi *P. aeruginosa* dengan metode PCR (Wahyudi *et al.*, 2022, Ciamak, 2022 and

Auda *et al.*, 2015). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* pada sampel isolat klinis *P. aeruginosa* dari sampel klinis pasien di rumah sakit.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, autoclave, incubator, centrifuge, mikroskop, kaca objek, ohse, collection tube, GD column, microcentrifuge micropipet, waterbath, vortex, spektrofotometer UV-Vis, chamber elektroforesis, Polymerase Chain Reaction Thermal Cycler Machine T100, Biorad UV-Transilluminator Gel Doc.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya isolat bakteri *P. aeruginosa*, kristal violet, safranin, Standar Mc Farland nomor 3, NaCl 0,9, Media Nutrient Agar (NA), Media Mac Conkey (MC), Media uji biokimia: Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Sulfit Indol Motility (SIM), Urea, Citrat, Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP), Phenyl Alanine Deaminase (PAD), Media Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa, Reagen Erlich, Methyl Red (MR), Ferri Klorida 105, Kalium Hidroksida 40%, Presto Mini gDNA Bacteria Kit.

Sampel Isolat Klinis

Bakteri *P. aeruginosa* berasal dari pasien di Rumah Sakit dr. Moewardi Surakarta yang berjumlah 6 sampel. Berasal dari 2 sampel sputum, 2 sampel urine dan 2 sampel pus. Isolat bakteri dikarakterisasi dengan pewarnaan Gram dan media uji biokimia.

Karakterisasi Bakteri

Isolat *P. aeruginosa* dilakukan identifikasi dengan pengecatan Gram dan uji biokimia. Isolat tersebut ditumbuhkan pada media NA

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan pada media MC diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni pada media MC dilakukan pengecatan Gram dan diamati dibawah mikroskop. Koloni tersebut dilakukan uji biokimia diinkubasi 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh ditanam kembali pada media NA diinkubasi 37°C selama 24 jam (Wahyudi *et al*, 2019).

Isolasi DNA Pseudomonas aeruginosa

Isolat *P. aeruginosa* pada media NA dibuat suspensi sel pada NaCl 0,9% dengan membandingkan kekeruhannya pada standar MC Farland nomor 3, disentrifuge 3000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang, diambil endapan untuk dilakukan isolasi DNA. Centifuge kembali endapan 16.000 xg selama 1 menit (buang supernatant) pada endapan ditambahkan 180 ul GT buffer (resuspensi), suspensi tersebut ditambahkan 20 µl proteinase K, inkubasi 60°C selama 10 menit (bolak balik setiap 3 menit). Setelah 10 menit ditambahkan 200 µl GB buffer (campur n10 detik) dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit (bolak balik setiap 3 menit). Setelah inkubasi ditambahkan sebanyak 200 ul etanol absolut (kocok kuat). Campuran dipindahkan pada GD column yang sudah terpasang collection tube dicentrifuge 16.000 xg selama 2 menit (buang cairan di collection tube). Sebanyak 400 µl W1 buffer ditambahkan pada GD column disentrifuge 16.000 xg selama 30 detik (buang cairan di collection tube), setelah dibuang ditambahkan 600 µl wash buffer pada GD column dicentrifuge 16.000 xg selama 30 detik (buang cairan di collection tube), centrifuge kembali 16.000 xg selama 30 detik untuk

mengeringkan. GD *column* dipindahkan ke mikrosentrifuge, ditambahkan 100 µl etanol buffer (Presto Mini gDNA Bacteria Kit) (Wahyudi *et al.*, 2022).

Uji Kualitatif Isolat DNA

Uji kualitatif isolat DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 1,5% yang dilarutkan dalam TBE 1x. Uji kualitatif dilakukan dengan cara membuat campuran 5 µl isolat DNA, 3 µl *loading dye* dan 2 µl gel red, yang kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose. Elektroforesis dilakukan pada voltase 90 volt, arus listrik sebesar 400 ampere selama 30 menit.

Uji Kuantitatif Isolat DNA

Uji kuantitatif isolat DNA dilakukan dengan membuat pengenceran sebanyak 400x, dengan volume 20 µl isolat DNA dan 2980 µl aquabidest. Hasil dari campuran tersebut dilakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 260 nm dan λ 280 nm. Dengan perhitungan konsentrasi dan kemurnian sebagai berikut :

1. Nilai kemurnian DNA :
 λ 260nm / λ 280nm.
2. Nilai konsentrasi DNA :
 λ 260nm x 50 x factor pengencer.

(Handoyo & Rudiretna, 2017; Wahyudi *et al.*, 2022).

Amplifikasi Gen *alg44*, *oprL*, dan *toxA* dengan PCR

Amplifikasi gen *alg44* dilakukan dengan menggunakan primer *forward* 5'-ATG TCC AGA ACC TCA AGC CG-3' dan primer *reverse* 5'-ATG GTG ATC TGC TGG TTG GG-3' dengan panjang amplicon 316 bp (Wahyudi *et al.*, 2022).

Untuk amplifikasi gen *oprL* menggunakan primer *forward* 5'-ATG GAA ATG CTG AAA TTC GGC-3' dan primer *reverse* 5'-CTT CTT CAG CTC GAC GCG ACG-3' dengan panjang amplicon 504 bp (Ciamak, 2022) , sedangkan untuk amplifikasi gen *toxA* menggunakan primer *forward* 5'-GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACCA-3' dan primer *reverse* 5'-CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGCG-3' dengan panjang amplicon 396 bp (Dong *et al.*, 2015). Sebelum dilakukan PCR, dibuat campuran yang terdiri dari 12 µl *master mix*, 2 µl primer *forward*, 2 µl primer *reverse*, *nuclease free water* sebanyak 4 µl dan DNA *template* sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam microtube dan dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan pengaturan pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing (*alg44*;65°C, *oprL*;47°C, *toxA*;65°C) selama 30 detik, ekstension 72°C selama 1 menit dan final ekstension 72°C selama 5 menit (Wahyudi *et al.*, 2019).

Hasil PCR dilakukan elektroforesis gel agarose 1,5% dengan memasukkan sebanyak 2 µl hasil PCR, 3 µl *loading dye*, dan 2 µl gel red yang dicampur diatas parafilm dan dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose dan dilakukan elektroforesis selama 90 menit.

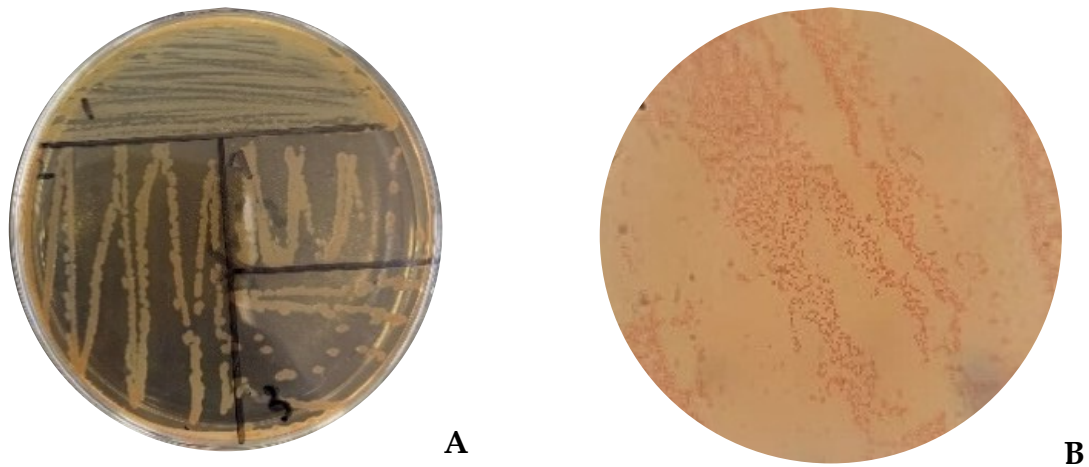
HASIL

Karakterisasi Bakteri

Hasil dari karakterisasi 6 isolat klinis (sputum, urin, dan pus), pada pewarnaan Gram didapatkan hasil yang sama pada keenam sampel yaitu berbentuk batang, sel bakteri berwarna merah dengan sifat Gram negatif (Gambar 1). Hasil dari uji biokimia menghasilkan karakteristik yang sama pada semua sampel yaitu sampel sputum (S.1 D dan S.2), sampel urine

(U.1 dan U.2) dan sampel pus (P.1 dan P.2), sehingga dapat disimpulkan isolat-isolat tersebut berkerabat dekat,

untuk memastikan spesies-spesies isolat tersebut masih perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut (Tabel 1).



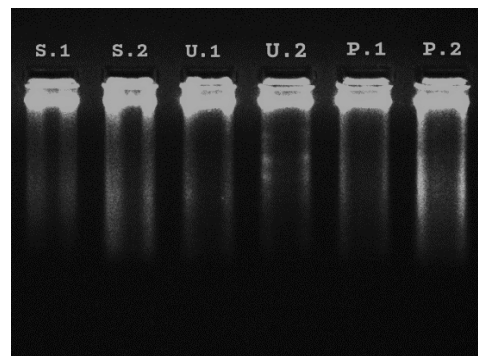
Gambar 1. Koloni *P.aeruginosa* pada Media MC (A), Gambaran Mikroskopis *P.aeruginosa* dengan Pengecatan Gram (B).

Tabel 1. Hasil Karakterisasi *P.aeruginosa* dengan Uji Biokimia

Kode Sampel	TSIA		SIM			Urea	Citrat	MR	VP	PAD	Ferm Karbohidrat				
	Ferm	H ₂ S	Gas	Indol	Motil						H ₂ S	Glu	Man	Mal	Lak
S.1	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S.2	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
U.1	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
U.2	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P.1	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P.2	AL/AL	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolasi DNA *Pseudomonas aeruginosa*

Hasil dari isolasi DNA *P. aeruginosa* dilakukan uji kualitatif dengan elektroforesis gel agarose terlihat adanya pita DNA yang tebal, menandakan bahwa pada hasil isolasi DNA terdapat DNA *P. aeruginosa* (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Visualisasi Isolat DNA *P.aeruginosa* sebagai Uji Kualitatif Isolate DNA

Uji Kuantitatif Isolat DNA

Hasil dari uji kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat dilihat pada Tabel 2.

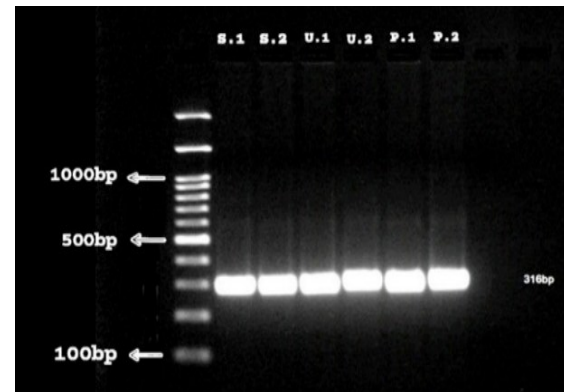
Tabel 2. Hasil Uji Kuantitatif DNA *P.aeruginosa*.

Kode Sampel	Λ 260	Λ 280	Kemurnian Sampel	Konsentrasi Sampel
S.1	0,003	0,002	1,5	60
S.2	0,042	0,035	1,2	840
U.1	0,006	0,004	1,5	120
U.2	0,043	0,038	1,1	860
P.1	0,043	0,035	1,2	860
P.2	0,005	0,003	1,7	350

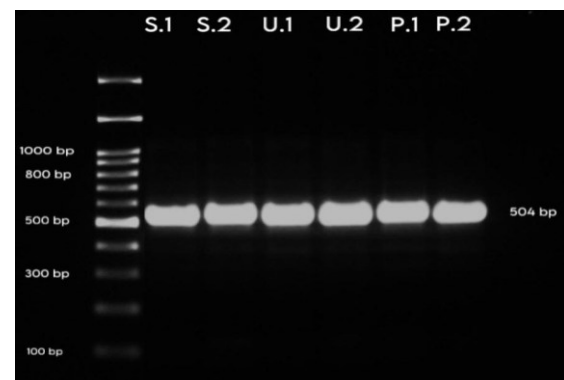
Berdasarkan hasil uji kuantitatif DNA pada tabel 2, diperoleh nilai konsentrasi terendah adalah 60 pada sampel S.1 dan konsentrasi tertinggi 860 pada sampel U.2 dan P.1. Sedangkan nilai kemurnian menunjukkan bahwa keseluruhan sampel yang diuji lebih rendah dari rasio kemurnian DNA yaitu 1,8-2,0 sehingga dapat dikatakan bahwa isolat tidak murni, berdasarkan metode isolasi DNA yang telah dilakukan, masih perlu dilakukan optimasi untuk memperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang lebih baik.

Hasil amplifikasi PCR pada gen *alg44* menunjukkan bahwa gen dapat teramplifikasi dengan baik dengan panjang amplicon sebesar 316 bp, dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR pada gen *oprL* menunjukkan bahwa gen dapat teramplifikasi dengan baik dengan panjang amplicon 504 bp (Gambar 4). Hasil ampifikasi dengan PCR pada gen *toxA* menunjukkan bahwa gen dapat teramplifikasi dengan baik dengan

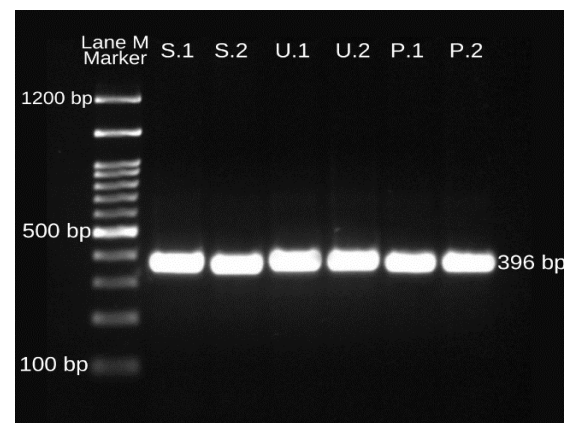
panjang amplicon 396 bp yang dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 3. Hasil Visualisasi Produk PCR pada Gen *alg44*



Gambar 4. Hasil Visualisasi Produk PCR pada Gen *oprL*



Gambar 4. Hasil Visualisasi Produk PCR pada Gen *toxA*

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri yang didapatkan dari Rumah Sakit Umum Daerah dr. Moewardi yang berupa kultur murni bakteri *P.*

aeruginosa pada media cair. Uji konfirmasi dilakukan dengan pengamatan mikroskopis dan uji biokimia. Hasil pengecatan Gram dapat dilihat pada gambar 1, pada hasil tersebut ditemukan bakteri berwarna merah dengan susunan tersebar bersifat Gram negatif. Hasil uji biokimia yang dapat dilihat pada tabel 1 yang berdasarkan Wahyudi & Soetarto (2021) yang menyatakan bahwa hasil uji biokimia *P. aeruginosa* menunjukkan fermentasi alkali/alkali pada media TSIA, H₂S (-), gas (-), indol (-), motil (+), urea (-), citrat (+), MR (-), VP (-), PAD (-) dan fermentasi karbohidrat (-). Berdasarkan uji karakterisasi yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa koloni pada sampel bakteri tersebut merupakan benar *P. aeruginosa* Bergey, 1994; Wahyudi *et al.*, 2024).

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan Gram, pengamatan koloni pada Media MacConkey dan uji biokimia (Tabel 1), *P. aeruginosa* dari sampel sputum, urin, dan pus menunjukkan karakteristik yang sama, hal ini juga sudah dikonfirmasi dengan uji identifikasi bakteri dengan menggunakan alat semi automatic yaitu *Vitec-2 Compact* menunjukkan hasil yang sama. Ini bisa menjadi satu bukti pendahuluan bahwa kemampuan *enzimatic metabolism* pada *P. aeruginosa* tidak berubah ketika bakteri tersebut menginfeksi di organ tubuh yang berbeda, meskipun hal ini perlu dikonfirmasi dengan penelitian lebih lanjut, namun hasil penelitian yang sama juga ditunjukkan oleh Wahyudi *et al.* (2019) yang menunjukkan bahwa hasil uji biokimia *P. aeruginosa* dari beberapa sampel (darah, sputum, urin, telaga tengah, pleura, pus, feces, dan

cairan jaringan menunjukkan hasil uji biokimia yang sama juga.

Penelitian dilanjutkan dengan melakukan isolasi DNA menggunakan *Presto™ Mini Bacteria Kit* dengan beberapa tahapan diantaranya *lysis*, *DNA binding*, *wash* dan *elution*. Sampel yang digunakan adalah kultur murni bakteri *P. aeruginosa* yang dibuat suspensi bakteri dengan mengencerkan koloni bakteri dalam NaCl 0,9% steril yang kemudian kekeruhannya dibandingkan dengan standar kekeruhan *McFarland* nomor 3. Pengenceran *McFarland* nomor 3 setara dengan $9,0 \times 10^8$. Hasil visualisasi produk isolasi DNA (gambar 2) mendapatkan hasil yang baik, namun masih terdapat *smear* yang cukup jelas. Adanya *smear* pada hasil uji kualitatif kemungkinan disebabkan karena masih terdapat kontaminan protein atau sisa larutan yang terbawa pada saat proses isolasi DNA (Wahyudi *et al.*, 2022).

Uji kuantitatif DNA bertujuan untuk mengetahui nilai konsentrasi dan kemurnian dari sampel isolat DNA. Konsentrasi DNA dapat diketahui dengan mengukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm. DNA yang baik memiliki konsentrasi diatas 100 ng/ μ l dan nilai kemurnian diantara 1,8 - 2,0 (Reid, 1991).

Berdasarkan hasil uji kuantitatif pada tabel 2 menggunakan *instrument Spektrofotometer UV-Vis* dapat disimpulkan isolat DNA memiliki konsentrasi yang baik tetapi pada sampel S.1 memiliki konsentrasi yang kurang baik dan memiliki nilai kemurnian yang rendah. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Wahyudi *et al.*, (2024) DNA dengan nilai kemurnian 1,12 - 1,64 mampu teramplifikasi dan menghasilkan pola pita yang jelas. Kemurnian isolat DNA

yang kurang dari 1,8 kemungkinan menandakan bahwa hasil ekstraksi DNA terkontaminasi oleh protein dan sel debris. DNA yang memiliki kemurnian yang rendah tidak mengganggu pada proses amplifikasi dengan PCR apabila primer yang digunakan spesifik.

Hasil penelitian mengindikasikan bahwa semua isolat memberi sinyal positif terhadap 3 (tiga) gen yang diuji, dibuktikan dengan panjang amplicon sesuai dengan yang diharapkan. Hal ini mengindikasikan bahwa gen-gen tersebut terdapat pada isolat yang diuji, walaupun masih perlu dilakukan konfirmasi, dengan melakukan DNA sekuensing. Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa semua sampel dapat teramplifikasi gen *alg44* dengan produk 316 bp. Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Wahyudi *et al.*, (2022) yang membuktikan bahwa pada isolat klinis *P. aeruginosa* dapat terdeteksi gen *alg44*.

Berdasarkan penelitian ini ditemukan gen *oprL* pada 6 sampel isolat klinis *P. aeruginosa* atau sebesar 100%, hal inimenandakan terdapatnya gen *oprL* sebagai salah satu faktor virulensi pada 6 isolat klinis *P. aeruginosa* (gambar 4). Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Chand *et al.* (2021) yang membuktikan bahwa dari 87 isolat *P. aeruginosa* yang didapatkan dari *Tertiary Hospital Nepal* ditemukan 38 isolat *P. aeruginosa* atau 43,48% menunjukkan adanya resistensi dengan kehadiran gen *oprL* sebanyak 100%.

Hasil visualisasi produk PCR dari gen *toxA* menunjukkan bahwa pita DNA dari 6 sampel yang diteliti telah mencapai target primer yaitu 396 dapat dilihat pada Gambar 5. Maka pada 6 sampel yang diteliti 100 % terdapat gen *toxA* sebagai salah satu penyebab

patogenitas dari isolat klinis bakteri *P. aeruginosa* tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Ciamak, (2022) dengan hasil 44 (84,62%) sampel dari 52 sampel penelitian terdapat gen *toxA* sebagai prevalensi gen patogen *P. aeruginosa*. Oleh karena itu, hasil penelitian sebelumnya mendukung temuan hasil penelitian ini bahwa prevelensi gen *toxA* sebagai gen faktor virulensi penyebab patogen bakteri *P. aeruginosa*

Adanya gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* pada *P. aeruginosa* tidak dipengaruhi oleh jenis sampel. Untuk mengetahui perbedaan tersebut, maka perlu dilakukan identifikasi dengan menggunakan gen lain atau dengan mengukur ekspresi gen yang dihasilkan pada beberapa sampel tersebut untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi pada setiap sampel yang digunakan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa hasil identifikasi (mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia) isolat bakteri dari sampel sputum, urin, dan pus menunjukkan hasil karakter biokimia yang sama, yang diduga isolat-isolat tersebut berkerabat dekat satu sama lain. Gen *alg44*, *oprL* dan *toxA* terdeteksi pada semua isolat *P. aeruginosa* dengan metode *Polymerase Chain Reaction*.

DAFTAR PUSTAKA

- Auda, I. G., Kadmy, I. M. S. A. L., Ali, A. N. M., Muslim, S. N., & Salman, I. M. (2015). *toxA* Gene as a Chromosomal Marker for Rapid Identification of Otitis Media *Pseudomonas Aeruginosa*. *Int'l Journal of Advances in Chemical Engg, & Biological Sciences*, 2 (1).

- Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lipincott Williams & Wilkins.
- Chand, Y., Khadka, S., Sapkota, S., Sharma, S., Khanal, S., Thapa, A., Rayamajhee, B., Khadka, D. K., Panta, O. P., Shrestha, D., & Poudel, P. (2021). Clinical Specimens are the Pool of Multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Harboring *oprL* and *toxA* Virulence Genes: Findings from a Tertiary Hospital of Nepal. *Emergency Medicine International*, 2021, 1–8.
- Ciamak, G. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence of Pathogenic Genes, *OprL* and *ToxA* in Human and Veterinary Clinical Samples in Ardabil, Iran, 2020. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*.
- de Sousa, T., Silva, C., Igrejas, G., Hébraud, M., & Poeta, P. (2025). The Interactive Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Global Ecology. *Journal of Basic Microbiology*, 65(4), e70004.
- Djasfar, S.P & Pradika, Y. (2023). Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial (*Pseudomonas aeruginosa*) Pada Lantai Intensive Care Unit (ICU). *Jurnal MedLab*, 2(1).
- Dong, D., Zou, D., Liu, H., Yang, Z., Huang, S., Liu, N., He, X., Liu, W., & Huang, L. (2015). Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from. *fortiers in Microbiology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01100>
- Gawad, M. A., & Gharbi, W. A. (2022). Molecular Detection of *oprI* and *oprL* Virulence Genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burns and Wounds. In *Iraqi Journal of Biotechnology* (Vol. 21, Issue 2).
- Hattab, J., Guardiani, P., & Tiscar, P. G. (2021). Occurrence, antimicrobial susceptibility, and pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* in canine clinical samples. *Vet World*.14, 978–985.
- Khosravi, A. D., Shafie, F., Montazeri, E. A., & Rostami, S. (2016). The frequency of genes encoding exotoxin A and exoenzyme S in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*, 42(5), 1116–1120.
- Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Quick Protocol. (2016). *Bacteria genomic DNA extraction kit optimized for genomic and viral DNA purification from Gram negative bacterial cells and Gram positive bacterial cells*. Geneaid Biotech Ltd, Taiwan.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7:199, 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Reid, G. A. (1991). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn: by J. Sambrook, EF Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (3 vols; 1659 pages) ISBN 0 87969 309 6.
- Syarif, M. R., Kurniawaty, E., & Rahmawati, S. (2024). Resistensi Antibiotik terhadap *Pseudomonas*

- aeruginosa: Literature Review. *Medical Profession Journal of Lampung*, 14(8), 1659-1663.
- Wahyudi, D., & Soetarto, E. S. (2021). Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* pada Beberapa Media Cair. *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 10(2), 35-40.
- 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 Journal of Biological Diversity*, 20(5).
- Wahyudi, D., Silviani, Y., Nirwana, A. P., & Saroh, D. (2024). Deteksi Gen Resisten Kloramfenikol (cat) pada Isolat Klinik *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *SCIS-CITATIO*, 5(1), 10-19.
- Wahyudi, D., Wimpy, & Saroh, D. (2022). Detection of Gene Alg8 And Alg 44 in Clinical Isolates *Pseudomonas aeruginosa* Using Polymerase Chain Reaction Method. *Indonesian Journal of Global Health Research*, 4(4).
- Zhou, E., Seminara, A. B., Kim, S. K., Hall, C. L., Wang, Y., & Lee, V. T. (2017). Thiol-benzo-triazoloquinazolinone Inhibits Alg44 Binding to c-di-GMP and Reduces Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*, 12(12), 3076-3085.