

1. PLASMID
2. AMPICILIN
3. IMMUNITY

IR PERPUSTAKAAN UNIVERISTAS AIRLANGGA

Diterbitkan untuk ujian tahap II

DISERTASI

**ANGKA KEJADIAN DAN KARAKTERISASI
PLASMID PENGKODE KEBAL OBAT PADA LINGKUNGAN
DENGAN BERBEDA TINGKAT PENGGUNAAN ANTIMIKROBA**

STUDI KEKEBALAN PADA OBAT AMPISILIN DAN
PLASMID PENGKODE KEBAL AMPISILIN
DI RSUD DR. SOETOMO SURABAYA

KK

Dis
Dik K 31/102.

Kun

a.



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

KUNTAMAN

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1999

**ANGKA KEJADIAN DAN KARAKTERISASI
PLASMID PENGKODE KEBAL OBAT PADA LINGKUNGAN
DENGAN BERBEDA TINGKAT PENGGUNAAN ANTIMIKROBA**

**STUDI KEKEBALAN PADA OBAT AMPISILIN DAN
PLASMID PENGKODE KEBAL AMPISILIN
DI RSUD DR. SOETOMO SURABAYA**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga**

Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD.

**Untuk dipertahankan di hadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga**

**Oleh
KUNTAMAN
NIM. 099411767 D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1999**

Lembar Pengesahan

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL: 30 JULI 1999


Oleh

Promotor



**Prof. Dr. Noor Rachman, dr., SpMK
NIP 130 162 010**

Ko-Promotor



**Prof. Dr. . Imam Supardi, dr., SpMK
NIP 130 321 206**

Telah diuji pada ujian tertutup (**Tahap I**)

pada tanggal **28 Juli 1999**

SUSUNAN PANITIAN PENGUJI DISERTASI

Ketua	Prof. Atasiati Idajadi, dr., SpMK
Anggota	1. Prof. Dr. Noor Rachman, dr., SpMK
	2. Prof. Dr. Imam Supardi, dr., SpMK
	3. Prof. Widjoseno Gardjito, dr., SpBU
	4. Prof. Eddy Pranowo Soedibyco, dr., MPH
	5. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK
	6. Prof. Ketut Suata, dr., PhD., SpMK
	7. Widodo J. Pudjirahardjo, dr., MS., MPH., Dr. PH
	8. Wayan T Artama, Drh., PhD.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor:6046/J03/PP/1999
Tanggal : 2 Agustus 1999

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami ucapkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena perkenanNya kami dapat menyelesaikan Disertasi ini dengan seluruh kegiatan akademis yang berkaitan.

Selama menjalankan pendidikan Doktor, sungguh banyak bantuan dan dorongan moril dari berbagai pihak. Untuk itu perkenankanlah kami menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

Prof. Dr. Noor Rachman, dr., SpMK, selaku promotor beliau banyak memberi dorongan dan berbagai pertimbangan sebelum kami melangkah. Atas dorongan beliau pula semasa menjabat sebagai Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, kami berani melangkah untuk memasuki pendidikan Doktor.

Prof. Dr. Imam Supardi., dr., SpMK, selaku Ko-promotor, beliau banyak memberi arah disertasi kami. Melalui beliau pula, bersama Promotor, banyak memberi dorongan dan masukan sehingga ide awal penelitian kami tercetus.

Bapak Rektor Universitas Airlangga Prof. H Soedarto, dr., DTM&H, PhD, dan mantan Rektor Prof. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr. atas ijin yang diberikan sehingga saya dapat melanjutkan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Bapak Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H Soedijono Tirtowidardjo, dr. yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk dapat melanjutkan pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang atas perkenan dan ijin Beliau kami dapat mengikuti pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas

Airlangga; Bapak Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang atas perkenan beliau kami dapat melakukan penelitian di tempat tersebut.

Drh. Wayan T. Artama, PhD., Kepala Laboratorium Biokimia, Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Melalui beliau kami banyak mendapat tambahan penguasaan di bidang biologi molekuler. Atas perkenan beliau sebagai Kepala Laboratorium Biokimia, dan Prof. Joedoro Soedarsono, PhD selaku Direktur PAU, kami dapat memanfaatkan fasilitas di tempat tersebut.

Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK, sangat banyak masukan dari beliau baik mengenai materi disertasi kami maupun tentang penggunaan alat laboratorium di TDC Universitas Airlangga.

Prof. Atasiati Idajadi, dr., SpMK, yang selama persiapan kami, baik penyiapan proposal saat seminar maupun saat ujian, beliau banyak sekali memberi masukan demi penyempurnaan disertasi kami.

Prof. Widjoseno Gardjito, dr., SpBU, meskipun beliau seorang klinisi di bidang Bedah, namun minat beliau di bidang kekebalan antimikroba sangat menonjol. Ide-ide beliau banyak memberi inspirasi bagi kami dalam mengembangkan penelitian kami.

Dr. Widodo J. Pudjirahardjo, MS., MPH., Dr.PH, kepada beliau kami selalu mendapatkan masukan penyusunan metodologi disertasi kami dari sejak awal sampai kami dapat menyelesaikan penelitian kami.

Staf pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr., Prof. Abdul Gani, SH., MS., Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH., Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr., SpAK, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Fuad Amsyari, dr., MPH., PhD., Dr. M Zainudin, Apt., Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.,

Prof. Soetandyo Wignjosoebroto, Dr. Siti Pariani, dr., Kuntoro, dr., MPH., DrPH., Dr. Sarmanu, drh., MS.

dr. Ny. Endang Warsiki Ghozali dan dr. Tri Arimanto Yuwana dari Lab/Instalasi Ilmu Kedokteran Jiwa dan dr. Sunarjo Hardjowijoto dari Lab/Instalasi Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas bantuan dan perkenan beliau saya dapat mengerti dan mengetahui banyak keadaan lokasi penelitian di rumah sakit tersebut.

dr. Eddy Mudihardi, MS., SpMK, Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang dengan tulus selalu mengikuti perkembangan kami serta dorongan untuk segera menyelesaikan pendidikan.

Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc, Direktur Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, bahwa kami dapat melakukan kegiatan penelitian kami adalah atas bantuan dan perkenan beliau untuk dapat memanfaatkan Laboratorium TDC

Pak Chosen di Laboratorium TDC Unair; Endang, Emi, Nani dan Gatot di Jurusan Analis Medis Fakultas Kedokteran Unair; Mas Djo dan mbak Arsiah di Laboratorium Biokimia PAU Biokimia UGM Yogyakarta; segenap staf paramedis di Lab/Instalasi Ilmu Kedokteran Jiwa dan Bedah RSUD Dr. Soetomo Surabaya, kami sampaikan terima kasih atas kerjasamanya yang baik dan bantuannya selama bekerja di alboratorium.

Kasih sayang dan terima kasih kami yang tulus kepada seluruh keluargaku, isteriku Drg. Nanik Zubaidah, anakku Ari, Wiwid dan Tika yang telah merelakan saya menyisihkan waktu untuk menyelesaikan pendidikan program Doktor. Kami mohon maaf banyak menyita waktu untuk keluarga. Terima kasih atas pengertian kalian yang tulus.

Akhirnya kami menyampaikan mohon maaf atas segala sesuatu yang kurang berkenan, semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu melimpahkan rahmatNya.

RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan mengetahui seberapa jauh plasmid pengkode kebal ampisilin yang dipisahkan dari bakteri flora limbah cair rumah sakit, bisa dipergunakan sebagai petanda tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan rumah sakit. Juga ingin mengetahui apakah bakteri flora limbah (*Escherichia coli*) di rumah sakit bisa dipergunakan sebagai petanda penyebaran kebal antimikroba di rumah sakit akibat penggunaan antimikroba pada penderita, dalam kaitan pemberantasan infeksi nosokomial.

Antimikroba yang diteliti adalah golongan beta laktam khususnya ampisilin, di ruang perawatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Parameter yang diteliti adalah angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin dan karakter plasmid. Karakter plasmid diartikan sebagai dua makna yaitu: 1). ukuran plasmid dan 2). tipe plasmid. Tipe plasmid diartikan sebagai keberadaan bersama gen kebal nir-ampisilin terhadap gen kebal ampisilin pada isolat plasmid, yang sering disebut kebal ganda (*'multi resistance'*).

Pendataan penggunaan antimikroba di kedua lokasi penelitian dilakukan setiap hari sampai selama 3,5 bulan. Parameter tingkat penggunaan antimikroba dinyatakan dengan prosen penderita yang dirawat dengan mendapat antimikroba yang diteliti, dan dosis (dalam gram) rata-rata antimikroba yang diberikan per penderita.

Sebagai sampel penelitian adalah *Escherichia coli* flora limbah rumah sakit di RP IKJ (Ruang Perawatan Ilmu Kedokteran Jiwa) dan RP BU (Ruang Perawatan Bedah Urologi) yang selanjutnya dicari *Escherichia coli* yang telah kebal terhadap ampisilin dengan menggunakan uji kepekaan cara pengenceran agar. Plasmid dipisahkan dari *Escherichia coli* yang kebal menggunakan cara alkali (*'Lysis by alkali'*) dan dilanjutkan

dengan uji transformasi pada bakteri acuan (*Escherichia coli* galur DH5alfa). Ukuran plasmid ditera menggunakan hasil foto pita plasmid pada elektroforesis agar yang telah di cat menggunakan etidium bromid, berdasar kesetaraan kedudukan pita plasmid terhadap pita petanda ('Marker') *lambda HindIII*.

Pada setiap sel transforman, dilakukan penentuan antibiogram yaitu uji kepekaan terhadap 10 antimikroba patokan dengan menggunakan cara difusi cakram. Hal ini untuk mencari adanya ekspresi gen kebal antimikroba selain ampisilin. Kekebalan sel transforman terhadap berbagai antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin), dipergunakan menggolongkan plasmid menjadi beberapa tipe.

Penggunaan antimikroba golongan cincin beta laktam khususnya ampisilin di RP IKJ menunjukkan tingkat yang lebih rendah secara bermakna dibanding penggunaan antimikroba yang sama di RP BU, baik dilihat persentase penderita yang mendapat antimikroba maupun dosis rata-rata antimikroba yang dikonsumsi tiap penderita ($p=0,001$ untuk ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin maupun gabungan semua obat golongan beta laktam). Di RP IKJ, persentase penderita yang mendapat ampisilin adalah 5,33%, gabungan semua obat golongan beta laktam adalah 8,28%. Tidak ada penderita yang mendapatkan sulbenisilin maupun sefalosporin. Persentase penderita yang mendapat ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin dan gabungan semua antimikroba golongan cincin beta laktam di RP BU berturut-turut adalah 23,83%, 32,64%, 23,83% dan 73,58%. Dosis antimikroba rata-rata yang diberikan pada tiap penderita di RP IKJ untuk ampisilin adalah 0,3728 g, gabungan semua obat golongan beta laktam adalah 0,5024 g dan tidak ada penderita yang mendapat sulbenisilin maupun sefalosporin. Sedangkan di RP BU

berturut-turut untuk ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin dan gabungan semua obat golongan beta laktam adalah 0,9793 g, 2,3927 g, 0,9684 g dan 4,444 g.

Sebanyak 210 *Escherichia coli* telah dipisahkan masing-masing dari limbah cair rumah sakit di kedua lokasi penelitian. Pada uji kepekaan cara pengenceran agar, didapatkan *Escherichia coli* kebal ampisilin sebanyak 171 (81,4%) di RP IKJ dan 174 (82,90%) di RP BU. Perbedaan ini secara statistik tidak bermakna pada batas kemaknaan 5%, dengan nilai $p = 0,7989$. Tidak adanya perbedaan ini menurut peneliti karena kekebalan yang sudah sangat tinggi atau tingginya paparan bahan nir-antimikroba di limbah yang bisa mengakibatkan perubahan dinding sel bakteri dan diikuti peningkatan kekebalan terhadap antimikroba.

Pada semua *Escherichia coli* yang kebal ampisilin, diperiksa adanya plasmid pengkode kebal ampisilin dengan uji transformasi. Sebanyak 28 (16,37%) galur *Escherichia coli* dari RP IKJ menunjukkan adanya plasmid pengkode kebal ampisilin, sedangkan di RP BU mencapai 58 (33,33%) galur. Perbedaan ini secara statistik bermakna pada batas kemaknaan 5% dengan nilai $p=0,001$. Hal ini berarti **hipotesis diterima** atau bisa dikatakan angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin di RP IKJ lebih rendah dibanding RP BU. Kesimpulan dari fakta di atas, bahwa makin tinggi penggunaan antimikroba, akan diikuti dengan makin tingginya angka kejadian plasmid pengkode kebal antimikroba.

Plasmid pengkode kebal ampisilin dari kedua lokasi penelitian dipisahkan dan dianalisis untuk mengetahui ukuran plasmid, dan juga untuk mengetahui tipe plasmid yang menunjukkan adanya ekspresi gen pengkode kekebalan selain kebal ampisilin yang berada

bersama dengan plasmid pengkode kebal ampisilin yang sering dikenal dengan kebal ganda (*'Multi resistance'*).

Ukuran plasmid dinyatakan dalam tiga kelompok, kelompok 1 dengan ukuran sama atau lebih kecil dari 4.361 bp (*'base pair'* = pasangan basa), kelompok 2 lebih besar 4.361 bp sampai dengan 9.416 bp, dan kelompok 3 lebih besar 9.416 bp sampai dengan 23.130 bp. Pada semua (28) isolat plasmid dari RP IKJ, mempunyai ukuran dalam kelompok 1. Sedangkan isolat plasmid dari RP BU, 38 (65,5%) plasmid dengan ukuran kelompok 1, 10 (17,2%) plasmid dengan ukuran kelompok 2 dan 10 (17,2%) dengan ukuran kelompok 3. Ukuran plasmid pada kedua lokasi penelitian berbeda bermakna pada batas kemaknaan 5% dengan nilai $p= 0,001$. Hal ini berarti **hipotesis diterima** atau bisa disimpulkan bahwa ukuran plasmid yang berasal dari RP IKJ, lebih kecil dibanding isolat plasmid dari RP BU.

Pada semua isolat plasmid, baik dari RP IKJ maupun RP BU, ditemukan sebanyak 3 tipe plasmid yang masing-masing mengekspresikan kebal antimikroba berikut ini:

- a. Tipe 1 : Ampisilin, Eritromisin, Kanamisin, Trimetoprim
- b. Tipe 2 : Ampisilin, Kloramfenikol, Trimetoprim
- c. Tipe 3 : Ampisilin

Angka kejadian tipe plasmid tersebut pada RP IKJ adalah: plasmid tipe 1 tidak ada, plasmid tipe 2 sebanyak 3 (10,71%), dan plasmid tipe 3 sebanyak 25 (89,29%). Di RP BU angka kejadian plasmid tipe 1 sebanyak 4 (6,9%), plasmid tipe 2 sebanyak 6 (10,34%) dan plasmid tipe 3 sebanyak 48 (82,76%). Perbedaan ini **tidak bermakna** pada batas kemaknaan 5% dengan nilai $p= 0,3627$. Hal ini berarti **hipotesis ditolak**. Pada analisis jumlah gen kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin) pada setiap tipe plasmid,

ternyata juga tidak ada beda antara isolat asal RP IKJ dibanding RP BU ($p=0,3822$). Antara ukuran plasmid dengan jumlah gen kebal pada tiap tipe plasmid juga tidak menunjukkan korelasi yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ukuran plasmid tersebut di atas **kecil kemungkinan** akibat penggabungan dengan plasmid pengkode kebal nir-ampisilin, dan terjadinya kebal ganda tidak ditentukan oleh tinggi atau rendahnya tingkat penggunaan antimikroba.

Dari data diatas dapat diartikan bahwa:

- 1). Angka kejadian dan karakter plasmid dapat dipergunakan sebagai petanda untuk mengetahui tingkat penggunaan antimikroba pada lingkungan. Penggunaan antimikroba (cincin beta laktam) yang makin sering dan dosis makin tinggi, sangat berkaitan dengan makin tingginya angka kejadian plasmid pengkode kekebalan, dan disertai pula makin besarnya ukuran plasmid yang bersangkutan.
- 2). Flora bakteri dapat dipergunakan sebagai petanda (indikator) tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan khususnya rumah sakit. Hal ini sangat berkaitan dengan pola kekebalan bakteri di rumah sakit dalam kaitan pemberantasan infeksi nosokomial. Dengan bisa dimanfaatkannya bakteri limbah, maka untuk penentuan pola kepekaan bakteri di rumah sakit tidak harus menunggu isolat yang berasal dari penderita.
- 3). Kejadian kebal ganda (*'multi resisten'*) tidak berkaitan dengan tinggi atau rendahnya penggunaan antimikroba, tapi oleh sebab lain yang perlu dicari penyebabnya.

ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the effects of antimicrobial used on the incidence rate and the characteristics of the resistance plasmids in hospital waste water. The characteristic of plasmids were defined as the plasmid size and the joining presence of non-ampicillin resistance expressed gene in ampicillin selected transformant cells. The selected antimicrobial chosen in this research were beta-lactam drug, particularly ampicillin, and consequently the plasmid that encodes for ampicillin resistance. Two hospital's wards as research locations were Psychiatry ward and Urology ward of Dr. Soetomo Regional General Hospital Surabaya.

The usage of ampicillin and the total amount of the beta-lactam drugs, in Psychiatry ward were significantly less than in Urology ward. These differences were the frequency of inpatient who got an antimicrobial drug or the averages of the drugs dose (in g) consumed per patient. The frequency of Psychiatry ward patients receiving an ampicillin and all kinds of beta-lactam drug were 5.33%, and 8.28%, and no patients got sulbenicillin or cephalosporine, whereas in Urology ward, the patients got an ampicillin, sulbenicillin, cephalosporine and all kinds of beta-lactam drug were 23.83%, 32.64%, 23.83% and 73.58% respectively. The average dose of the drug consumed per patient, for ampicillin and the total amount of the all beta-lactam drugs, in Psychiatry ward were 0.3728 g and 0.5024 g per patient and no patients got sulbenicillin or cephalosporine; whereas in Urology ward patients got an ampicillin, sulbenicillin, cephalosporine and the



total amount of the all beta-lactam drugs were 0.9793 g, 2.3927 g, 0.9684 g and 4.444 g respectively.

The bacteria's samples were 210 *Escherichia coli* strain isolated from each hospital ward. The isolated ampicillin resistance strains were 171 (81.4%) strains from Psychiatry ward and 174 (82.90%) strains from Urology ward, and the difference was not statistically significant.

The plasmids mediated ampicillin resistance were detected on 28 (16.37%) strains of *Escherichia coli* isolated from Psychiatry ward, and 58 (33.33%) strains from Urology ward. These results were significantly different. The plasmids sizes of Psychiatry ward origin were significantly smaller than Urology ward origin. Conversely, the amount of any resistance antimicrobial gene (ampicillin and non-ampicillin) on each ampicillin associated plasmid, were not significantly different for both locations.

The conclusions are: the incidence rate and characters of antimicrobial (beta lactam drugs) resistance plasmids can be used as a tools for detecting environmental antimicrobial uses. The bacteria of hospital waste water can be used as a sample for predicting the antimicrobial susceptibility pattern in environment as a consequence of antimicrobial uses in hospitalized patients

Key words Antimicrobial resistance plasmid, Beta-lactam drug, Ampicillin, Hospital waste water, *Escherichia coli*

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL DISERTASI	i
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
PANITIAN PENGUJI DISERTASI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN	viii
<i>ABSTRACT</i>	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BATASAN DAN KETERANGAN SINGKATAN	xxiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.4. Manfaat Penelitian	10
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Kekebalan Bakteri Terhadap Antimikroba	12
2.2. Plasmid Pengkode Kekebalan dan Transposon	16
2.2.1 Plasmid pengkode kekebalan	16
2.2.2 Transposon	24
2.3. Epidemiologi Bakteri Kebal Antimikroba	29
2.4. Bakteri Koliform Flora Rumah Sakit	31
2.5. Antimikroba Golongan Cincin Beta Laktam	32
2.6. Perkembangan Penelitian Plasmid Pengkode Kebal Antimikroba	35
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual Peran Plasmid pada Terjadinya Kebal Antimikroba	37
3.2 Hipotesis Penelitian	41
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1. Pendekatan Penelitian	42
4.2. Tempat Penelitian dan Pengambilan Sampel	42
4.2.1 Tempat penelitian	42
4.2.2 Pengambilan sampel penelitian	43
4.3. Tingkat Penggunaan Antimikroba di Lokasi Penelitian	43
4.4. Populasi, Sampel Penelitian dan Besar Sampel	44
4.4.1. Populasi sampel	44
4.4.2. Sampel penelitian	44

4.4.2.1. Unit analisis	44
4.4.2.2. Cara pengambilan sampel	45
4.4.2.2. Besar sampel penelitian	45
4.5. Tempat Pemeriksaan	47
4.6. Pemeriksaan Mikrobiologis	48
4.7. Uji Kepekaan Cara Pengenceran Agar	49
4.8. Pemeriksaan Kekebalan Dikode Plasmid	50
4.8.1. Isolasi plasmid dari <i>Escherichia coli</i> sampel	50
4.8.2. Transformasi plasmid pada <i>Escherichia coli</i> kompeten dan uji seleksi	50
4.8.2.1 Penyiapan <i>Escherichia coli</i> kompeten ('Competent <i>Escherichia coli</i> ') sebagai penangkap plasmid ('Recipient')	51
4.8.2.2 Transformasi plasmid pada <i>Escherichia coli</i> kompeten dan uji seleksi	52
4.8.3 Visualisasi dan peneraan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin ...	53
4.8.4 Penentuan ekspresi gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin sebagai penyerta gen pengkode kebal ampisilin pada sel transforman	54
4.9. Variabel, Parameter dan Analisis Statistik	55
4.9.1. Variabel bebas	55
4.9.2. Variabel tergantung	55
4.9.2.1 Pola kekebalan	55
4.9.2.2 Pola kekebalan yang dikode plasmid	56
4.9.2.3 Ukuran plasmid	56
4.9.2.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram pada sel transforman	56
 BAB 5. ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN	
5.1. Data Penelitian	
5.1.1 Tingkat penggunaan antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	58
5.1.2 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin yang dikode plasmid	
5.1.2.1 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin	62
5.1.2.2 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin yang dikode plasmid	63
5.1.3 Ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin	65
5.1.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram sel transforman	72
5.2. Analisis dan Hasil Penelitian	
5.2.1 Tingkat Penggunaan Antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	79
5.2.2 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin yang dikode plasmid	80
5.2.2.1 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin	80
5.2.2.2 Isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin yang dikode plasmid	80
5.2.3 Ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin	81
5.2.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram sel transforman	82

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1. Tingkat Penggunaan Antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	83
6.2. Isolat <i>Escherichia coli</i> Kebal Ampisilin	86
6.3. Isolat Plasmid Pengkode Kebal Ampisilin	89
6.4. Ukuran Plasmid	96
6.5 Tipe Plasmid Berdasar Gen Kebal Antimikroba (selain ampisilin) Sebagai Gen Penyerta, Berdasar Antibiogram pada Sel Transforman	101
6.6 Rangkuman Pembahasan	106

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	110
--	-----

DAFTAR PUSTAKA	112
-----------------------------	-----

DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel 2.1	Beberapa contoh enzim beta laktamase dan penggolongannya	13
Tabel 2.2	' <i>Insertion Sequence</i> ' (IS) yang ditemukan pada <i>Escherichia coli</i> K-12	26
Tabel 4.1.	Angka pengali ('Multiplier') dari pada σ^2/δ^2 untuk sampel berpasangan, dan $2\sigma^2/\delta^2$ pada sampel bebas, yang dibutuhkan untuk menentukan besar masing-masing sampel	47
Tabel 4.2	Mekanisme kerja dan peran gen kebal pada beberapa antimikroba	54
Tabel 4.3	Jenis antimikroba uji dan pedoman penentuan kekebalan pada uji kepekaan cara difusi cakram terhadap sel transforman	55
Tabel 5.1.	Jenis dan jumlah penyakit pada penderita rawat inap RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	59
Tabel 5.2.	Distribusi penggunaan antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	61
Tabel 5.3.	Dosis ampisilin dan antimikroba golongan cincin beta laktam yang lain yang diberikan pada penderita di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	61
Tabel 5.4.	Hasil pemeriksaan kepekaan pada 210 isolat <i>Escherichia coli</i> terhadap ampisilin pada isolat dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	62
Tabel 5.5.	Hasil uji transformasi untuk mencari adanya plasmid pengkode kebal ampisilin pada 171 isolat <i>Escherichia coli</i> kebal ampisilin yang dipisahkan dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan 174 isolat dari RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	63
Tabel 5.6.	Potongan petanda (Marker) faga <i>Lambda</i> yang dipotong dengan enzim <i>HindIII</i>	65

	Halaman	
Tabel 5.7	Distribusi plasmid berdasar kelompok ukuran panjang, pada <i>Escherichia coli</i> isolat dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	71
Tabel 5.8	Hasil uji kepekaan cara difusi cakram pada <i>Escherichia coli</i> <i>DH5alfa</i> terhadap berbagai antimikroba.	73
Tabel 5.9	Hasil uji kepekaan sel transforman terhadap beberapa jenis antimikroba yang menunjukkan tipe plasmid pada sel transforman.	75
Tabel 5.10	Perubahan kekebalan sel transforman TBE77 yang berasal dari <i>Escherichia coli</i> DH5alfa setelah mendapatkan plasmid dari sampel <i>Escherichia coli</i> BE77 yang berasal dari RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	75
Tabel 5.11	Jumlah gen yang berada bersama pada tiap tipe plasmid pada 86 plasmid pengkode kebal ampisilin di RSUD Dr. Soetomo Surabaya	78
Tabel 5.12	Hasil perhitungan statistik distribusi ukuran plasmid berdasar kelompok dengan uji khi kuadrat, pada isolat dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	81
Tabel 6.1	Plasmid pengkode kebal antimikroba isolat dari <i>Escherichia coli</i> yang berasal dari tinja hewan (lembu, ayam, babi) yang tergolong dalam satu grup inkompatibilitas.	99
Tabel 6.2	Angka kejadian ekspresi gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin yang tergabung dalam plasmid pengkode kebal ampisilin	102
Tabel 6.3	Tingkat penggunaan antimikroba selain golongan cincin beta laktam di RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	103

DAFTAR GAMBAR

	Halaman	
Gambar 2.1	Gambar skematis plasmid di dalam sel bakteri dengan sebuah contoh gambar skematis <i>pBR322</i> yang berisi dua gen kebal antimikroba yakni gen kebal ampisilin dan gen kebal tetrasiklin.	17
Gambar 2.2	Alur perpindahan plasmid cara konjugasi pada bakteri negatif Gram(Guiney, 1984)	20
Gambar 2.3.	Model relaksasi DNA plasmid pada proses perpindahan plasmid secara konjugasi (Guiney, 1984)	21
Gambar 2.4	Struktur transposon kompleks (A) dan transposon komposit (B).	27
Gambar 2.5.	Transposisi transposon secara replikatif (a) dan cara konservatif atau insersi sederhana (b) (Russel and Chopra,1990).	29
Gambar 3.1	Kerangka konseptual terjadinya kekebalan pada bakteri.	37
Gambar 3.2	Bagan alir pencemaran ampisilin atau antimikroba golongan beta laktam yang lain, di lingkungan rumah sakit.	40
Gambar 4.1	Struktur gen <i>Lac</i> pada <i>Escherichia coli</i>	51
Gambar 4.2.	Bagan alir metode penelitian	57
Gambar 5.1	Foto hasil uji transformasi positif dengan kontrol <i>pBR322</i>	64
Gambar 5.2.	Hasil foto polaroid petanda <i>lambda HindIII</i> dan <i>pBR322</i> yang mempunyai berat 4,363 kb.	66
Gambar 5.3.	Hasil foto elektroforese agar terhadap isolat plasmid pengkode kebal ampisilin dari sampel TBE77 (sel transforman <i>Escherichia coli</i> DH5alfa dengan isolat plasmid dari sampel <i>Escherichia coli</i> BE77 dari RP BU).	67

- Gambar 5.4 Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforese agar menggunakan pengecatan etidium bromid, dari sel transforman *Escherichia coli DH5alfa* dengan sampel nomor 14 dari RP BU dan ditemukan plasmid ukuran 7 kb. 68
- Gambar 5.5 Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforese agar dengan pengecatan etidium bromid, dari sel transforman *Escherichia coli DH5alfa* dengan sampel nomor 6, 22 dan 55 dari RP BU dan ditemukan plasmid ukuran sekitar 15 kb. 69
- Gambar 5.6 Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforese agar dengan pengecatan etidium bromid, dari sel transforman *Escherichia coli DH5alfa* dengan sampel nomor 1, 6, 15, 17, 20, 26, 29 dan 37 dari RP IKJ dan ditemukan plasmid ukuran sekitar 3,5 kb. 70
- Gambar 5.7. Hasil foto polaroid isolat plasmid dari *pBR322-Escherichia coli DH5alfa*, sel transforman (TBE77) dan *Escherichia coli* sampel (BE77), serta hasil uji kepekaan terhadap 10 jenis antimikroba 77
- Gambar 6.1. Kebal antimikroba pada *Shigella* spp, tahun 1974-1982. 92
- Gambar 6.2. Angka kejadian *Klebsiella pneumonia* kebal sefalosporin penghasil *ESBL* dan bukan penghasil *ESBL* di ruang Perawatan Intensip Rumah Sakit, setelah pembatasan penggunaan seftasidim (beta laktam oksimiino) (Pena et al, 1998) 94

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Lembar evaluasi dan pendataan penggunaan obat pada penderita di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya	122
Lampiran 2	Tatacara pemeriksaan aglutinasi, biokimiawi dan motilitas <i>Escherichia coli</i> (A) pemisahan plasmid (B), Pembuatan sel kompeten (C), uji transformasi (D), Uji kepekaan cara difusi cakram (E) dan pembuatan reagen (F)	123
Lampiran 3	Penggunaan antimikroba (dalam gram) pada penderita rawat inap di RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	132
Lampiran 4	Perhitungan statistik dengan program komputer SPSS/PC+ terhadap frekuensi dan dosis penggunaan antimikroba di RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	138
Lampiran 5	Hasil pemeriksaan uji kepekaan dan uji transformasi <i>Escherichia coli</i> isolat dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya; pene-raan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin dan uji kepekaan sel transforman.	147
Lampiran 6	Perhitungan statistik dengan Program komputer SPSS/PC+ terhadap isolat <i>Escherichia coli</i> dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya	156

BATASAN ISTILAH DAN KETERANGAN SINGKATAN

A.M.	= Antimikroba
Antibiogram	= Pola kekebalan bakteri terhadap berbagai A.M. acuan
Amp	= Ampisilin
Nir-amp	= Nir (bukan) ampisilin
BBB	= Batu Buli-buli
bp	= <i>base pair</i> = pasangan basa sebagai satuan panjang DNA
BPH	= <i>Benign Prostat Hypertrophy</i>
CAP	= <i>Catabolic Activator Protein</i>
Da	= Dalton
DTK	= Daya Tolak Kolonisasi ('Colonization Resistance')
EDTA	= <i>Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid</i>
EMB	= <i>Eosin Methylen Blue</i>
ESBL	= <i>Extended Spectrum Beta lactamase</i>
FK	= Fakultas Kedokteran
IR	= <i>Inverted Repeat</i>
IS	= <i>Insertion Sequence</i>
kb	= 'kilo base pair' = kilo pasangan basa = 1000 bp
KDa	= Kilo Dalton
Kebal A.M.	= Bakteri yang mampu tumbuh pada paparan antimikroba pada kadar KHM atau lebih

KHM	= Kadar Hambat Minimal = Kadar antimikroba terkecil dimana bakteri sudah tidak mampu tumbuh.
l	= liter
Lab	= Laboratorium
LB	= <i>Media Luria Bertani</i>
LF	= ' <i>Loss of Plasmid Free Cell</i> ' = Jumlah dalam prosen bakteri yang menjadi terbebas dari kandungan plasmid
Lingk-1	= lingkungan-1 = Ruang rawat inap Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya
Lingk-2	= lingkungan-2 = Ruang rawat inap Ilmu Kedokteran Jiwa RSUD Dr. Soetomo Surabaya
MH	= Mueller Hinton agar
ml	= mililiter
μ l	= mikroliter
μ g	= mikrogram
mm	= milimeter
NCCLS	= <i>Nasional Committee for Clinical Laboratory Standard</i>
OmpF	= <i>Outer membrane protein F</i>
PBP	= <i>Penicillin Binding Protein</i>
PRS	= Psikosa Reaktif Singkat
RNA-pol	= <i>RNA polimerase</i>
SOO	= Sindroma Otak Organik

- Tn = Transposon
- TSI = *Triple Sugar Iron*
- RP BU = Ruang Perawatan Bedah Urologi, RSUD Dr. Soetomo Surabaya
- RP IKJ = Ruang Perawatan Ilmu Kedokteran Jiwa, RSUD Dr. Soetomo
Surabaya

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi Nosokomial (IN) adalah infeksi yang terjadi oleh penularan bakteri di lingkungan rumah sakit (Janas, 1984). Penyebab IN kebanyakan adalah bakteri flora normal (Goldman *et al.*, 1981; Ringerz *et al.*, 1990; Subagyo dan Karim, 1985; Sjahrodji, 1990; Tiruneh, 1990), dan kebanyakan bersifat kebal ganda (Goldman *et al.*, 1981; Ringerz *et al.*, 1990; Sjahrodji, 1990; Tiruneh, 1990). Golongan bakteri flora normal, yang selalu ada di alam, lingkungan dan tubuh manusia, adalah golongan koliform (Gallis, 1980). Diantara golongan ini yang sering menyebabkan infeksi adalah *Enterobacter spp* dan *Escherichia coli* (Goldman *et al.*, 1981; Ringerz *et al.*, 1990; Senerva *et al.*, 1991; Sjahrodji, 1990; Tiruneh, 1990).

Rumah sakit yang merupakan lingkungan terbatas adalah tempat dengan jumlah penggunaan antimikroba relatif besar. Pada penelitian yang dilakukan di 10 Rumah Sakit Pendidikan di Indonesia pada tahun 1987 didapatkan hasil rata-rata 68,3% penderita yang dirawat mendapat antimikroba (Surbakti, 1988). Sedang di luar rumah sakit relatif lebih kecil. Hasil penelitian Munaf (1992) pada 6 Puskesmas di Kabupaten Palembang dan pada dua Kabupaten di Sumatera Selatan, menunjukkan dari 3781 penderita yang berobat ke Puskesmas yang diambil secara acak, 49% mendapat antimikroba.

Kaitan antara banyaknya penggunaan antimikroba dengan kejadian kebal antimikroba, terutama yang diperankan plasmid, saat ini sudah banyak dilaporkan, namun terbatas pada bakteri penyebab penyakit pada penderita. Untuk bakteri isolat dari

lingkungan, terutama pada limbah cair rumah sakit, saat ini belum mendapat perhatian. Sedangkan bila hal ini dapat dimanfaatkan, akan lebih menguntungkan karena tidak harus mengganggu dan menunggu penderita untuk dipakai sebagai bahan sampel.

Pembahasan masalah plasmid pengkode kebal antimikroba dalam kaitan dengan tingginya penggunaan antimikroba, sampai saat ini selalu tertuju kepada seberapa jauh pengaruh plasmid terhadap keberhasilan pengobatan infeksi pada seorang penderita. Kalaupun dikaitkan dengan tingginya penggunaan antimikroba, hanya sebagai tujuan tambahan. Tampaknya karakter plasmid sampai saat ini belum dibahas secara optimal dalam kaitannya dengan tingkat penggunaan suatu antimikroba. Pada kesempatan ini peneliti ingin menggunakan plasmid sebagai bahasan utama dalam kaitannya dengan tingkat penggunaan antimikroba, dengan manfaat tambahan mengatasi masalah kekebalan bakteri terhadap antimikroba pada terapi seorang penderita penyakit infeksi.

Telah diketahui banyak kekebalan dikode plasmid seperti kekebalan terhadap ampisilin, tetrasiklin, kanamisin dan kloramfenikol (Senerva *et al.*, 1991; Campbell and Mee, 1987; Chaslus-Duncla *et al.*, 1991; Kitzis *et al.*, 1988; Christie and Dunny, 1984; Jallat *et al.*, 1994). Dilaporkan pula bahwa antimikroba kadar sub-letal (dibawah kadar bunuh) akan meningkatkan ekspresi plasmid kekebalan terhadap antimikroba yang bersangkutan (Christie and Dunny, 1984).

Plasmid kekebalan biasanya berisi gen yang mengkode protein, yang fungsinya mengganggu cara kerja antimikroba atau merusak susunan kimiawi antimikroba sehingga antimikroba menjadi tidak aktif. Pada peningkatan ekspresi plasmid kekebalan sebagai akibat paparan antimikroba kadar sub-letal, ternyata tidak hanya melakukan transkripsi dan translasi untuk membentuk suatu senyawa, namun plasmid tersebut juga melakukan

replikasi sehingga dalam satu sel bakteri berisi lebih banyak plasmid sejenis (Norstrom *et al.*, 1984; Christie and Dunny, 1984; Nordstrom and Austin, 1989). Kadar plasmid dalam sel yang makin tinggi, diketahui disamping makin sedikit sel bakteri yang terbebas dari kandungan plasmid, plasmid tersebut juga makin mudah pindah ke bakteri lain (Christie and Dunny, 1984; Guiney, 1984; Kitzis *et al.*, 1988; Reynaud *et al.*, 1991; Rice *et al.*, 1992). Perpindahan tersebut dikatakan makin mudah antara bakteri dalam satu spesies (Lambert *et al.*, 1988).

Berdasar kenyataan di atas peneliti berpendapat, angka kejadian plasmid pengkode kebal antimikroba dapat dipergunakan sebagai petunjuk penggunaan antimikroba di lingkungan, khususnya di rumah sakit, yang sampai saat belum ditelaah secara mendalam..

Peningkatan ekspresi plasmid yang disertai dengan peningkatan kadar plasmid dalam sel bakteri, ternyata juga menunjukkan perubahan karakter yang lain. Hal ini meliputi dua hal yakni: 1). karakter kebersamaan dengan plasmid lain dalam satu sel; 2). kecenderungan diantara plasmid yang sama melakukan penggabungan satu dengan yang lain yang dikenal dengan dimerisasi.

Bonnasie *et al.* (1990) dalam penelitiannya mendapatkan kenyataan bahwa peningkatan replikasi suatu plasmid, akan diikuti dengan derajat inkompatibilitas yang lebih rendah, dalam arti plasmid yang berbeda makin mudah berada bersama dalam satu sel. Hal ini kiranya akan meningkatkan kemungkinan penggabungan antara beberapa plasmid yang berbeda. Namun ada kenyataan lain, bahwa meningkatnya replikasi salah satu plasmid dalam sel bakteri akan menyebabkan plasmid lain keluar sel (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Kelihatannya keadaan ini sangat ditentukan oleh sifat plasmid pengkode kebal

antimikroba tersebut, khususnya apakah dalam satu grup inkompatibilitas yang sama atau berbeda.

Paparan eritromisin kadar sub-letal secara terus-menerus (selama tiga hari) pada *Staphylococcus epidermidis* yang berisi plasmid pengkode kebal eritromisin, ternyata berakibat terjadinya dimerisasi plasmid, sehingga diantara plasmid sejenis saling menggabung sehingga ukurannya menjadi makin besar sesuai deret hitung (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Keadaan serupa, walaupun tidak sama sepenuhnya juga dijumpai pada *Escherichia coli* yang mengandung gen *ampC* pada kromosom, dimana akibat paparan ampisilin, terjadi mutan kebal terhadap ampisilin. Hal ini ternyata disertai makin panjangnya gen *ampC* di kromosom (Normark *et al.*, 1977). Keadaan atau beberapa fakta di atas kiranya perlu ditelaah lebih lanjut untuk kemungkinan dapat dimanfaatkan sebagai petanda adanya penggunaan antimikroba di suatu lingkungan.

Pada pemakaian antimikroba untuk terapi penderita, khususnya di rumah sakit, adalah ditujukan untuk bakteri penyebab. Namun hal ini tidak dapat terbebas dari paparan antimikroba terhadap bakteri flora normal yang ada di tubuh penderita. Flora yang telah kebal ini diketahui menyebar ke orang di sekitarnya. Kenyataan ini didukung oleh beberapa penelitian berikut ini: 1). Angka kejadian bakteri kebal di suatu lingkungan, khususnya rumah sakit, dapat disebabkan oleh perpindahan (*'transmission'*) bakteri kebal dengan cara kolonisasi silang (*'cross colonization'*) dengan penderita, melalui tangan petugas kesehatan di rumah sakit (Struelens, 1998); 2). Anak yang dirawat di ruang perawatan intensip di rumah sakit yang diketahui banyak menggunakan kanamisin sebagai obat utama, bakteri *Escherichia coli* flora usus bayi tersebut banyak mengandung plasmid pengkode kebal kanamisin. Pada penelaahan yang dilakukan 12 bulan setelah bayi keluar

rumah sakit, ternyata 43% flora *Escherichia coli* bayi dan 33% flora *Escherichia coli* keluarganya mengandung plasmid pengkode kebal kanamisin. Hal ini sangat berbeda dengan bayi sehat yang tidak dirawat di ruang perawatan intensip, tidak ditemukan plasmid pengkode kebal kanamisin (Damato *et al.*, 1974); 3). Pada suatu terapi kloramfenikol selama 14 hari pada 15 orang anak anggota asrama yang dihuni oleh 107 orang anak, ternyata terjadi peningkatan *Staphylococcus epidermidis* kebal kloramfenikol, baik pada kelompok yang mendapat terapi maupun yang tidak. Bahkan juga ditemukan adanya peningkatan kejadian bakteri kebal selain kloramfenikol, baik pada kelompok terapi maupun yang tidak mendapat terapi (Bently *et al.*, 1970); 4). Pada suatu penelaahan flora *Escherichia coli* pada domba liar di Jepang, adanya plasmid pengkode kebal antimikroba ditemukan pada 2,5% siolat. Namun setelah ditangkap dan dipelihara di lingkungan penduduk, angka ini meningkat menjadi 97% (Kinjo *et al.*, 1992).

Jika lingkungan yang diamati adalah sebuah ruang perawatan di rumah sakit yang banyak menggunakan antimikroba, maka lingkungan di tempat tersebut, baik penderita, staf perawatan rumah sakit maupun lingkungan di sekitarnya, akan banyak mengandung flora bakteri kebal. Jika semua kegiatan kebersihan, baik mencuci tangan, mandi maupun pembersihan ruangan seialu berakhir dengan pembuangan limbah ke saluran buangan dari kamar mandi, maka dapat diduga bahwa banyak terdapat flora bakteri kebal di saluran buangan tersebut. Hal yang lebih khusus lagi adalah bahwa segala kegiatan pembuangan air kemih, dilakukan di saluran tersebut. Diketahui bahwa antimikroba yang diberikan pada penderita, khususnya ampisilin maupun antimikroba golongan beta laktam, sebanyak 30%-50% diekskresi dalam bentuk aktif di air kemih (Fiaherty and Gambertoglio, 1990). Hal ini kiranya akan memberi paparan lanjutan pada flora yang telah ada di limbah buangan

kamar mandi. Hal ini menunjukkan pentingnya air limbah sebagai sarana penelaahan bakteri kebal. Sampai kini penelaahan selalu dilakukan pada penderita infeksi.

Flora tubuh yang banyak di lingkungan adalah koliform, yang salah satunya *Escherichia coli*. Galur kebal ganda dari bakteri tersebut telah diketahui banyak menyebabkan infeksi di rumah sakit. Pada suatu penelaahan tentang flora usus pada bayi neonatus yang dirawat di rumah sakit, ditemukan tiga flora utama bakteri batang negatif Gram yang bersifat aerobik yaitu *Escherichia coli* sebanyak 43,44%, *Klebsiella pneumonia* sebanyak 50,71% dan *Enterobacter spp* sebanyak 5,90%. Sedangkan angka kejadian plasmid pengkode enzim beta laktamase ditemukan pada *Escherichia coli* kebal ampisilin sebanyak 93,23%, pada *Klebsiella pneumonia* sebanyak 15,8% dan pada *Enterobacter spp* tidak dijumpai enzim tersebut (Burman *et al.*, 1992). Disamping itu, telah banyak diketahui adanya kebal antimikroba yang dikode plasmid pada *Escherichia coli* (Damato *et al.*, 1974; Camphei and Mee, 1987; Tenover *et al.*, 1987; Kitzis *et al.*, 1988). Bakteri koliform biasanya sebagai flora usus manusia dan hewan, namun juga banyak di lingkungan, seperti benda di sekitar kita, air dan tanah (Gallis, 1980). Di dalam air bakteri ini mampu bertahan sampai beberapa bulan. Karena itu, bakteri koliform khususnya *Escherichia coli*, layak dipergunakan sebagai petanda penggunaan antimikroba di suatu lingkungan.

plasmid dan pernah dilaporkan pada plasmid pengkode kebal eritromisin, terjadinya peningkatan ukuran plasmid itu sendiri melalui mekanisme dimerisasi atau penggabungan antar plasmid sejenis sehingga ukurannya makin besar seperti deret hitung (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Kejadian lain menunjukkan bahwa pada galur mutan kebal *Escherichia coli* terhadap ampisilin, terjadi pemanjangan gen ampC pada kromosom (Normark *et al.*, 1977). Diketahui bahwa akibat peningkatan ekspresi plasmid yang disertai replikasi plasmid, dapat meningkatkan kompatibilitas (= makin mudah berada bersama) plasmid tersebut dengan plasmid lain dalam satu sel bakteri (Bonnasie *et al.*, 1990). Keadaan ini akan sangat menentukan munculnya bakteri kebal ganda ('*antimicrobial multi resistance*'). Tiap plasmid yang mengandung susunan atau gabungan beberapa gen kebal antimikroba yang sama, dikatakan mempunyai tipe sama. Namun pada plasmid lain justru terjadi sebaliknya, yakni plasmid lepas dan keluar dari sel bakteri (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Berdasar fakta ini maka timbul permasalahan kedua dan ketiga.

Permasalahan 2, apakah plasmid pengkode kebal ampisilin pada isolat bakteri dari lingk-1 dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi mempunyai ukuran lebih besar dibanding yang berasal dari flora *Escherichia coli* yang dipisahkan dari lingk-2 dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah.

Permasalahan 3, apakah ada perbedaan tipe plasmid antara isolat yang dipisahkan dari lingk-1 dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi dibanding isolat yang dipisahkan dari lingk-2 dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum:

Untuk mempelajari seberapa jauh peran plasmid pada kejadian bakteri kebal antimikroba, dan apakah kejadian dan karakter plasmid pengkode kebal antimikroba dalam limbah rumah sakit dapat dipergunakan sebagai petanda atau indikator terhadap tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan tersebut sebagai akibat penggunaan antimikroba pada terapi penderita

1.3.2 Tujuan khusus:

- a. Membuktikan bahwa kejadian kebal ampisilin yang dikode plasmid, lebih tinggi atau lebih sering ditemukan pada flora *Escherichia coli* yang dipisahkan dari lingk-1 (yaitu RP BU) dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi dibanding flora *Escherichia coli* yang dipisahkan dari lingk-2 (yaitu RP IKJ) dengan tingkat penggunaan antimikroba rendah.
- b. Membuktikan bahwa plasmid pengkode kebal ampisilin yang dipisahkan dari lingk-1 dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi mempunyai ukuran lebih besar dibanding yang dipisahkan dari lingk-2 dengan tingkat penggunaan antimikroba rendah.
- c. Membedakan tipe plasmid pengkode kebal ampisilin pada isolat *Escherichia coli* yang dipisahkan dari lingk-1 terhadap isolat yang dipisahkan dari lingk-2 dengan tingkat penggunaan antimikroba rendah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Menentukan tingkat penggunaan antimikroba dalam suatu lingkungan (rumah sakit), melalui pendekatan biologi-molekuler (genetik)

Diketahui bahwa akibat pengaruh antimikroba kadar subletal secara berkelanjutan, akan merupakan perangsang bagi plasmid pengkode kebal antimikroba untuk meningkatkan ekspresi dan memperbanyak diri. Salah satu akibat keadaan tersebut adalah adanya perubahan angka kejadian plasmid kekebalan serta perubahan karakter plasmid yang bersangkutan. Perubahan karakter tersebut meliputi ukuran plasmid dan kemungkinan adanya gen-gen pengkode kebal antimikroba lain yang bergabung, yang disebut kebal ganda (*'multi resistance'*).

1.4.2 Menentukan tingkat bahaya suatu kekebalan dalam lingkungan rumah sakit

Suatu kekebalan bakteri terhadap antimikroba dapat disebabkan oleh perantara plasmid maupun nir-plasmid. Adanya perantara plasmid, menurut peneliti menunjukkan makin tingginya tingkat bahaya suatu kekebalan karena pertimbangan berikut ini: 1). kekebalan bakteri terhadap antimikroba yang dikode plasmid biasanya mempunyai KHM yang tinggi; 2). akibat penggunaan dan paparan lebih lanjut dengan antimikroba, penyebaran kekebalan menjadi makin cepat; 3). plasmid kekebalan pernah dilaporkan bergabung dengan faktor keganasan pada *Escherichia coli*, sehingga perpindahan plasmid akibat paparan antimikroba juga berdampak penyebaran faktor keganasan *Escherichia coli*.

1.4.3 Menentukan kebijakan penggunaan antimikroba pada rumah sakit dalam kaitan mencegah peningkatan kekebalan pada bakteri rumah sakit, khususnya dalam kaitan penyebab infeksi nosokomial

Penggantian pemakaian suatu antimikroba pada saat ini hanya didasarkan pada hasil uji kepekaan. Antimikroba yang paling banyak bersifat kebal akan diganti dengan antimikroba lain. Masalah akan timbul jika angka kejadian kekebalan terhadap berbagai (minimal dua) antimikroba berada pada tingkat yang sama. Maka untuk memilih yang paling layak untuk dipakai diantara yang ada adalah antimikroba yang paling sedikit dikode oleh plasmid, atau antimikroba yang harus diganti adalah antimikroba yang mempunyai kekebalan yang lebih banyak dikode plasmid.

1.4.4 Mengembangkan penelitian lebih lanjut pemanfaatan plasmid sebagai petanda pencemaran berbagai bahan kimiawi.

Plasmid telah diketahui secara luas mempunyai berbagai fungsi, baik sebagai pengatur metabolisme sel bakteri maupun sebagai mekanisme organisme untuk mempertahankan diri terhadap pengaruh luar yang merugikan. Dengan model penelitian pada ampisilin dan plasmid pengkode ampisilin ini, dapat dikembangkan berbagai penelitian lain, baik terhadap bahan toksik maupun bahan nutrien yang mencemari suatu lingkungan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kekebalan Bakteri Terhadap Antimikroba

Kekebalan bakteri terhadap antimikroba (selanjutnya ditulis sebagai kekebalan) adalah kemampuan bakteri untuk menetralkan daya kerja antimikroba. Hal ini dapat melalui beberapa cara yakni: merusak antimikroba dengan enzim yang diproduksi; merubah reseptor titik tangkap antimikroba; mencegah antimikroba agar tidak dapat menembus dinding sel, yang kesemuanya dapat bersifat adaptasional, kromosomal maupun diperantarai plasmid (Davis, 1982; Dever and Dermody, 1991).

Enzim perusak antimikroba, khususnya terhadap golongan beta laktam, pertama dikenal pada tahun 1945 dengan nama penisilinase yang ditemukan pada *Staphylococcus aureus* dari seorang penderita yang mendapat pengobatan penisilin. Pada tahun 1965 ditemukan enzim serupa pada *Escherichia coli* pada seorang penderita yang mendapat terapi ampisilin dan diberi nama TEM β -laktamase (Dikutip dari Acar and Goldstein, 1998). Berdasar kedekatan struktur protein (susunan asam amino) dan sisi aktif ('active site') kini dikenal ada 4 klas enzim beta laktamase yang meliputi kelas A, B, C dan D (Massova and Mobashery, 1998). Enzim yang mempunyai kemiripan sekuen asam amino, dimasukkan dalam satu klas, sedangkan khusus klas B, juga ditandai dengan ketergantungan aktifitasnya pada ion seng ('Zinc dependent'). Beberapa contoh dan bakteri penghasil dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Kekebalan terhadap obat golongan beta laktam, juga dapat terjadi karena perubahan atau mutasi pada gen penyandi protein 'Penicillin Binding Protein' (PBP). Ada beberapa PBP dengan berbagai fungsi meliputi transpeptidase, transglikosilase dan

karboksipeptidase untuk sintesis peptidoglikan penyusun dinding sel bakteri. Ikatan obat golongan beta laktam pada *PBP* akan berakibat sintesis dinding sel bakteri terhambat dan sel mengalami lisis (Chairoux *et al.*, 1990). Pada prinsipnya ada dua kelompok *PBP* yakni dengan berat molekul tinggi yang berfungsi sebagai enzim transpeptidase dan transglukosilase, dan kelompok dengan berat molekul rendah yang berfungsi sebagai karboksipeptidase (Massova and Mobashery, 1998). Pada *Escherichia coli* dikenal ada *PBP*4, 5, 6, 7 dengan berat molekul rendah dan *PBP*1a, 1b, 1c, 2 dan 3 dengan berat molekul tinggi.

Tabel 2.1 Beberapa contoh enzim beta laktamase dan penggolongannya

Enzim beta laktamase		
Kelas	Nama	Bakteri penghasil
A	<i>OHIO-1</i> <i>SHV-1</i> <i>TEM-1</i> <i>OXY-2</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytosa</i>
B	<i>IMP-1</i> <i>B-II</i> <i>I-1</i>	<i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Xanthomonas maltophilia</i>
C	<i>MG1655</i> <i>P99</i> <i>FOX-3</i>	<i>Escherichia coli K-12</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumonia</i>
D	<i>OXA-18</i> <i>OXA-9</i> <i>OXA-1</i> <i>OXA-2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i>

Dalam kaitan dengan penembusan antimikroba melalui dinding sel bakteri, dikenal adanya protein pada lapisan luar dinding sel ('*outer membrane*') bakteri negatif Gram, yang dikenal dengan nama porin. Berkurangnya porin pada dinding sel bakteri, akan berakibat peningkatan kekebalan terhadap antimikroba (Burns and Clark, 1992). Hal ini

karena terganggunya penembusan obat ke dalam sel bakteri. Salah satu porin yang dikenal luas pada bakteri negatif Gram adalah protein *porin F* ('*Outer membrane protein F*' = *OmpF*') (Woodruff *et al.*, 1986; Kunin *et al.*, 1994; Komatsu *et al.*, 1991). Ekspresi gen porin dapat turun oleh pengaruh tekanan osmotik tinggi, asam salisilat atau garam bismut (Burns and Clark, 1992; Kunin *et al.*, 1994; Barron *et al.*, 1986). Mengingat adanya protein *OmpF* sangat berperan dalam transportasi obat dan bahan nutrisi lain ke dalam sel bakteri, maka peningkatan atau penurunan ekspresi gen tersebut akan sangat mempengaruhi kehidupan sel. Dikenal adanya gen *EnvZ* dan *OmpR* yang berfungsi mengatur ekspresi gen *OmpF* dan *OmpC*. Gen *OmpR* adalah pengkode protein *OmpR* sebagai represor terhadap ekspresi gen *OmpF*, sedangkan gen *EnvZ* adalah enzim histidin kinase yang berfungsi mengaktifkan gen *OmpR* melalui fosforilasi. Pada keadaan lingkungan dengan tekanan osmotik tinggi, *EnvZ* menjadi aktif, ekspresi *OmpR* meningkat, dan hal ini berakibat penurunan ekspresi gen *OmpF* dan peningkatan ekspresi gen *OmpC*. Demikian juga sebaliknya jika tekanan osmotik di sekitar rendah, maka ekspresi *OmpF* turun dan *OmpC* naik. Namun dilaporkan juga peningkatan ekspresi *OmpR* yang tidak melewati aktivasi gen *EnvZ*, tapi melalui donor fosfat yang lain. (Lan and Igo, 1998).

Peningkatan kekebalan bakteri terhadap berbagai antimikroba, juga sangat berkaitan dengan sistem transportasi bahan melalui dinding sel bakteri. Transportasi bahan ini dapat secara difusi ke dalam sel, atau melalui transport aktif melalui sistem pompa. Pada *Pseudomonas* dikenal ada tiga komponen sistem pompa ('*tripartite efflux pumps*') yang terdiri dari senyawa yang ada di membran dalam ('*inner membrane component*') misalnya protein *MexB*, *D* dan *F*; yang berada di membran luar seperti protein *OprM*, *J* dan *N* yang berfungsi sebagai penyusun saluran, dan protein perantara ('*membrane fussion*

protein') misalnya protein *MexA*, *MexC* dan *MexE* yang berfungsi merangkai komponen membran dalam dan membran luar. Sistem operon *MexA-MexB-OprM* dan *MexC-MexD-OprJ* sangat berperan mengatur transportasi bahan nutrisi termasuk obat melewati dinding sel (Srikumar *et al.*, 1998). Pada percobaan transformasi gen *MexC* dan *MexD* pada *Escherichia coli*, hanya dapat meningkatkan kekebalan terhadap penisilin yang bersifat hidrofobik, namun tidak terhadap golongan beta laktam lain yang bersifat hidrofilik. Transportasi bahan hidrofilik, biasanya membutuhkan saluran khusus pada dinding sel bakteri. Pada *Escherichia coli* ada sistem pompa sejenis yang diperankan oleh protein *AcrAB* ('acridine') sebagai komponen membran dalam dan protein *tolC* yang berada di membran luar. Sistem operon *AcrAB-tolC* ternyata sangat menentukan sifat kekebalan *Escherichia coli* terhadap berbagai antimikroba.

Telah diketahui adanya plasmid penentu kekebalan terhadap oksitetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, amikasin, kotrimoksazol, asam nalidiksat, sefasolin dan sefamando! (Senerwa *et al.*, 1991); trimetoprim (Campbell and Mee, 1987); apramisin (Chaslus-Dancla *et al.*, 1991); netilmisin, sisomisin dan sulfonamid (Kitzis *et al.*, 1988); eritromisin, linkomisin dan streptogramin B (Christic and Dunny, 1984); streptomisin, tikarsilin, neomisin dan tobramisin (Jallat *et al.*, 1994). Peran plasmid dalam menghasilkan kekebalan dapat melalui beberapa cara. Hal ini meliputi produksi enzim perusak antimikroba seperti pada kebal terhadap kloramfenikol, cincin beta laktam dan aminoglikosida; merubah sasaran seperti pada tetrasiklin, makrolid dan kotrimoksazol; menurunkan permeabilitas dinding sel bakteri terhadap antimikroba, seperti pada kebal terhadap kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim, cincin beta laktam dan aminoglikosida (Cooksey, 1991; Davis *et al.*, 1980).

2.2 Plasmid Pengkode Kekebalan dan Transposon

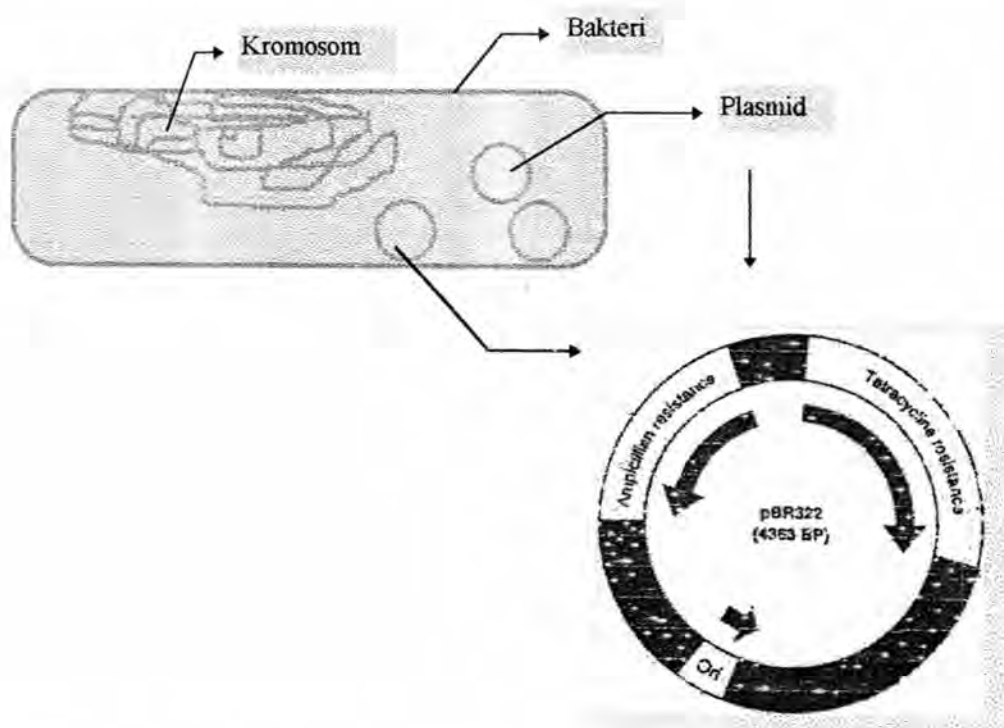
2.2.1 Plasmid pengkode kekebalan

Plasmid atau DNA ekstrakromosomal adalah rangkaian DNA yang berbentuk sirkuler, dan di dalam bakteri berada di sitoplasma di luar kromosom. Walaupun untuk hidup dan berbiak membutuhkan bakteri, atau organisme lain, namun pembiakan plasmid bersifat otonom, dalam arti tidak harus mengikuti pola pembiakan bakteri induk semang. Gambaran skematis kedudukan plasmid dalam bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.1. Di dalam plasmid berisi berbagai gen, yang salah satunya adalah gen pengkode kebal antimikroba. Salah satu contoh adalah *pBR322* yang berukuran 4,363 kb dan berisi gen pengkode kebal ampisilin dan gen kebal tetrasiklin (Hardy, 1986; Sambrook *et al.*, 1989; Russel and Chopra, 1990). Lihat Gambar 2.1. dan contoh *pBR322*.

Asal plasmid sampai sekarang belum diketahui dengan jelas. Dugaan kuat plasmid berasal dari organisme lain yang secara alamiah telah mengandung gen tersebut. Suatu mikroba yang secara alami dapat menghasilkan antibiotika, ternyata mikroba tersebut selalu kebal terhadap antimikroba yang dihasilkannya. Hal ini dapat dijumpai pada *Streptomyces griseus* penghasil streptomisin. Pada mikroba ini dapat ditemukan gen penghasil enzim transferase aminoglikosida yang dapat menetralkan streptomisin (Hotta *et al.*, 1992).

Pada bakteri negatif Gram, plasmid kekebalan biasanya termasuk plasmid kecil, yang mempunyai berat molekul ukuran 10 juta Dalton (kira-kira 15,3 kb='kilobase pairs') dan berada dalam sel pada kadar sekitar 15 plasmid per sel (Hardy, 1986). Plasmid besar dengan berat molekul lebih besar 40 juta Dalton, sering berada dalam kadar 1 - 2 plasmid



per sel. Satu pasangan basa ('Base pairs = bp') kira-kira mempunyai berat molekul 656 Dalton (data diambil dari plasmid ukuran 3,2 kb dengan berat molekul 2,1 juta Dalton) (Hardy, 1986). Sedangkan *Escherichia coli*, mempunyai kromosom dengan berat molekul 2,7 milyar Dalton (kira-kira 4.100 kb), bila direntangkan, panjangnya kira-kira 1,3 milimeter.



Gambar 2.1

Gambar skematis plasmid di dalam sel bakteri dengan sebuah contoh gambar skematis *pBR322* yang berisi dua gen kebal antimikroba yakni gen kebal ampisilin dan gen kebal tetrasiklin (Sambrook et al, 1989)

Keterangan:

Amp_R =  = gen pengkode kebal ampisilin
 Tet_R =  = gen pengkode kebal tetrasiklin

Pada bakteri, plasmid berkembang dengan susunan dan berat tertentu, dan sangat berkaitan dengan keadaan lingkungan. Pada penelaahan plasmid penentu kekebalan terhadap trimetoprim pada *Escherichia coli*, didapatkan bahwa dari hasil isolat pada manusia penderita rumah sakit, didapatkan berbagai macam potongan gen plasmid dengan berat bervariasi mulai 21,94 kb, 22,79 kb dan 27,18 kb, sedang plasmid yang berasal dari hewan babi dan manusia sekitarnya, potongan tersebut adalah 5,28 kb dan 8,81 kb. Setelah dianalisa dengan memotong plasmid tersebut dalam beberapa potongan kecil, ternyata gen yang berfungsi menentukan kekebalan adalah potongan gen dengan berat sama pada semua hasil isolat yakni 1,83 kb (Campbell and Mee, 1987). Plasmid penentu kekebalan terhadap tetrasiklin pada *Campylobacter jejuni* dan *Escherichia coli*, yang beratnya beragam dari 3 kb, 4,8 kb, 5 kb, 6 kb, 7,8 kb, 9,1 kb, 12 kb sampai 48 kb, ternyata setelah dipotong dengan berbagai enzim, semua mempunyai potongan seberat 2,5 kb yang menentukan kekebalan terhadap tetrasiklin (Tenover *et al.*, 1987). Telah pula ditemukan satu plasmid pada *Campylobacter spp.*, yang mengkode kebal tetrasiklin melalui dua mekanisme yakni gen pengkode protein antiportir yang meningkatkan pengeluaran tetrasiklin dari dalam sel; dan gen pengkode protein yang melindungi ribosom terhadap serangan tetrasiklin (Sloan *et al.*, 1994).

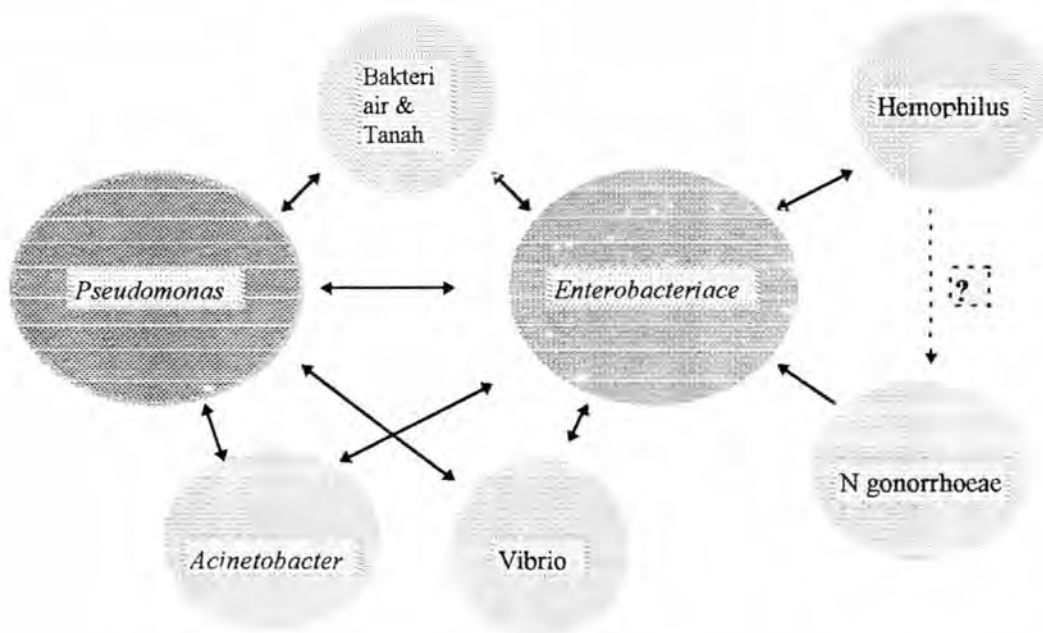
Pada penelaahan plasmid penentu enzim CTX-1 beta laktamase ('CTX = Cefotaximase'), ternyata sudah terjadi penyebaran diantara 23 strain bakteri yang meliputi 6 spesies yakni *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus morgani* dan *Serratia marcescens*. Penyebaran kekebalan ini diperankan oleh plasmid dengan berat 84 kb (Kitzis *et al.*, 1988).

Jallat *et al.* (1994) menemukan adanya plasmid dengan berat 140 kb pada *Escherichia coli*, yang berperan terhadap patogenitas dan kekebalan terhadap berbagai antimikroba, meliputi ampisilin, tetrasiklin, streptomisin, tikarsilin, sulfonamid, kanamisin, neomisin, gentamisin dan trimetoprim.

Perpindahan plasmid pengkode kebal antimikroba antar bakteri, khususnya bakteri negatif Gram, terutama melalui cara konjugasi. Bakteri dalam famili *Enterobacteriaceae* dan *Pseudomonas*, ditengarai sebagai reservoir utama plasmid pengkode kebal antimikroba melalui perpindahan konjugasi tersebut (Guiney, 1984). Alur asal dan arah konjugasi pada plasmid pengkode kebal antimikroba terhadap kedua reservoir tersebut dapat terhadap *Vibrio spp*, *Hemophilus*, *Acinetobacter*, bakteri air dan tanah, dan *Neisseria gonorrhoeae*. Lihat Gambar 2.2.

Perpindahan plasmid secara konjugasi, diawali dengan ikatan antara dua sel bakteri melalui perantara pili seks. Pada tempat perlekatan antara dua sel bakteri yang dikenal dengan titik perkawinan (*'Mating site'*), terjadi kontak erat antara dinding sel kedua bakteri, yang diikuti dengan pembentukan jalur perkawinan (*'Mating bridge'*). Keadaan diatas diikuti dengan terbentuknya protein relaksasi (*'relaxation protein'*) yang melekat pada tempat spesifik pada plasmid. Pada tempat ini akan terjadi pemutusan satu untai DNA (*'nick'*) sehingga plasmid menjadi relaks (relaks=berbentuk linkaran yang semula superkoil) dan terbentuk ujung 3' bebas dan ujung 5' bebas pada salah satu untai DNA yang mengalami *'nick'*. Dengan diawali ujung 5', satu untai DNA berpindah ke bakteri resipien dengan dilanjutkan pembentukan untai DNA komplementer di masing-masing sel bakteri. Proses ini diakhiri dengan pembentukan plasmid menjadi superkoil seperti semula (Guiney, 1984). Dikatakan bahwa titik *'nick'* (*'nick site'*) berada berdampingan dengan

ujung untai DNA yang pertama berpindah yang dikenal dengan *oriT* ('= *Origin of transfer*') (Ou and Anderson, 1970; Nordheim *et al.*, 1980; Guiney, 1984; Winans and Walker, 1985). Secara skematis perpindahan plasmid secara konjugasi dapat dilihat pada Gambar 2.3. (Guiney, 1984)

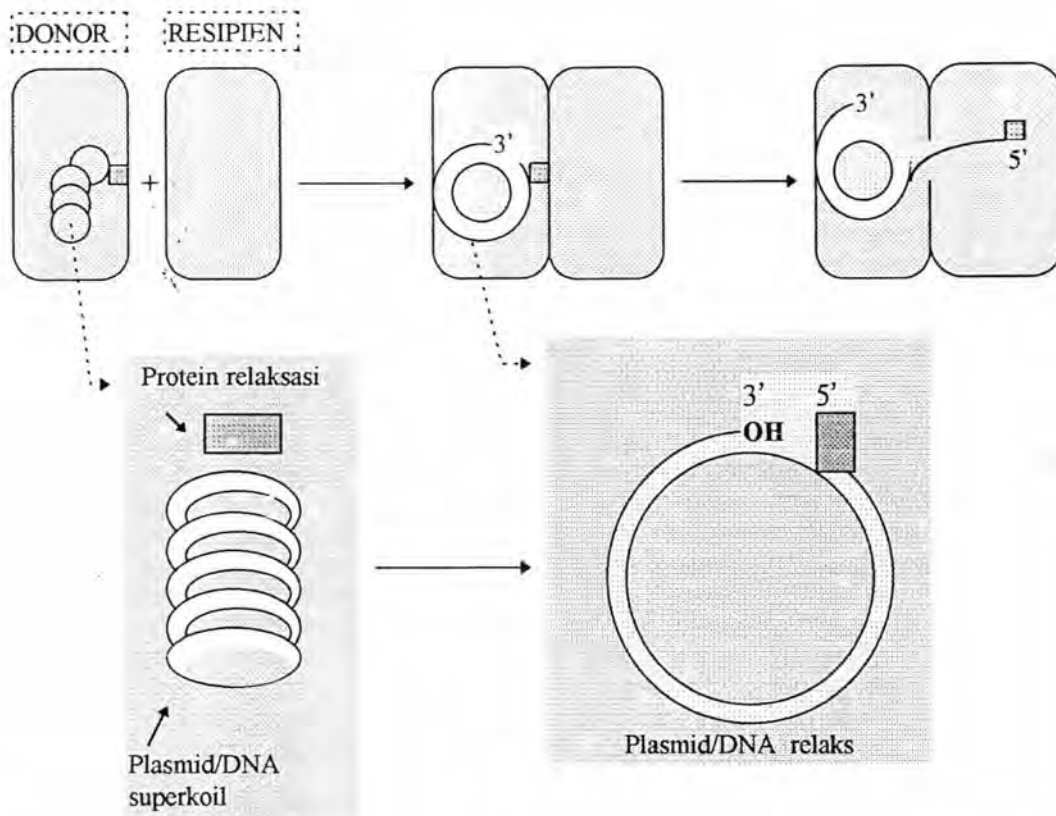


Gambar 2.2

Alur perpindahan plasmid cara konjugasi pada bakteri negatif Gram(Guiney, 1984)



Keterangan:

- Arah panah = arah perpindahan plasmid
 ? = Plasmid konjugatif belum terkarakterisasi



Gambar 2.3.
Model relaksasi DNA plasmid pada proses perpindahan plasmid secara konjugasi (Guiney, 1984)

Keterangan:

- 3' = ujung 3' untai DNA
- 5' = ujung 5' untai DNA
-  atau  = protein relaksasi ('relaxation protein')

Selain melalui konjugasi, perpindahan plasmid kebal antimikroba bisa terjadi melalui transformasi. Jika konjugasi terjadi antara dua bakteri hidup dan aktif, maka cara transformasi terutama dilakukan oleh DNA atau plasmid yang terlepas dari inangnya dan masuk ke bakteri lain yang hidup dan aktif. Jika suatu bakteri yang berisi plasmid

pengkode kebal antiimikroba kemudian mati dan lisis, apa yang akan terjadi?. Salah satu yang akan terjadi adalah bahwa gen atau plasmid tersebut akan keluar sel, masuk lingkungan dan baik dalam keadaan utuh atau terpotong akan masuk ke bakteri lain melalui proses transformasi. (Hudson and Michod, 1992).

Dikenal banyak teori atau hipotesis yang mendasari terjadinya transformasi gen atau untai DNA ke bakteri resipien. Hal ini meliputi beberapa teori berikut ini:

a. Teori DNA sebagai nutrisi (*'Nutrient hypothesis'*)

Teori ini mengatakan bahwa komponen DNA yang bisa bertindak sebagai nutrisi adalah bisa unsur karbon, nitrogen, energi atau untai nukleotida itu sendiri. Untai nukleotida sebagai nutrisi ternyata tidak hanya sebagai bahan makanan, namun lebih berfungsi sebagai pengganti untai DNA dalam bakteri yang rusak.

b. Teori DNA sebagai parasit (*'Parasite DNA hypothesis'*)

Pada teori ini dikatakan bahwa proses transformasi adalah masuknya gen yang justru merugikan resipien, namun menguntungkan bagi kelangsungan hidup gen yang masuk tersebut. Teori ini tidak banyak dianut.

c. Teori perbaikan DNA (*'DNA repair hypothesis'*)

Pada teori ini suatu transformasi sangat berkepentingan terhadap perbaikan DNA resipien yang rusak. Akibat keadaan ini, dua keadaan akan terjadi, yakni: 1). Proses perbaikan terhadap DNA yang rusak, dan 2). Suatu rekombinasi apabila ada untai DNA yang homolog. Pada proses kedua inilah besar kemungkinan terjadi peristiwa masuknya gen lain ke bakteri dan bergabung dengan kromosom bakteri atau gen DNA lain, seperti plasmid.

d. Teori keragaman genetik (*Variation hypothesis*).

Teori ini yang mendasari munculnya istilah seks berdasar variasi genetik. Suatu materi genetik selalu berusaha menyebar rata ke lingkungannya. Jika ada perpindahan gen dari satu organisme ke organisme lain, ini berarti ada seks. Jika populasi gen telah merata ke semua populasi bakteri di lingkungan maka keadaan disebut tidak ada seks. Jadi transformasi gen adalah peristiwa seksual.

Dalam kaitan gen atau plasmid pengkode kebal antimikroba, telah diketahui bahwa dalam keadaan bakteri terpapar antimikroba, maka akan terjadi peningkatan ekspresi plasmid, dimana kadar plasmid dalam sel akan meningkat. Keadaan ini akan mengakibatkan perubahan ke arah peningkatan variasi genetik atau ke arah ketidak seimbangan genetik. Berdasar teori keragaman genetik, bisa dikatakan bahwa akan terjadi peningkatan varians seks yang berarti proses aliran gen atau perkawinan akan meningkat. Hal ini yang akan meningkatkan penyebaran gen atau plasmid pengkode kebal antimikroba.

2.2.2 Transposon

Transposon adalah untai DNA yang mampu berpindah ('transposing') dari satu molekul DNA ('donor') ke DNA yang lain ('resipien'). Transposon tidak memiliki kemampuan sendiri untuk replikasi dan harus berada di dalam sistem replikon yang lain, misalnya plasmid atau kromosom (Russel and Chopra, 1990). Nama transposon ('*translocatable DNA sequence*') tidak dapat dipisahkan dari untai DNA yang disebut '*Insertion Sequence*' (*IS*). *IS* adalah potongan DNA yang dapat melakukan rekombinasi dengan DNA atau kromosom lain. Proses rekombinasi ini tidak membutuhkan gen *recA* seperti rekombinasi pada umumnya (Russel and Chopra, 1990), namun terjadi melalui proses yang disebut transposisi (Hardy, 1986; Russel and Chopra, 1990). Proses transposisi ini terjadi melalui pemutusan dan penyambungan kembali ikatan fosfodiester, namun tidak membutuhkan untai DNA homolog. Ini berbeda dengan rekombinasi pada umumnya yang membutuhkan untai DNA homolog antara DNA donor dan resipien (Bennett, 1992). Kemampuan transposon untuk dapat berpindah-pindah dari plasmid ke plasmid, hal ini dikatakan sangat menentukan pada evolusi plasmid (Farrar, 1983). Kekebalan antimikroba yang diperankan oleh transposon, kini telah diketahui pada ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, trimetoprim, streptomisin, kanamisin, neomisin, gentamisin, tobramisin dan makrolid (Farrar, 1983; Cooksey, 1991). Manfaat plasmid dalam penelaahan suatu sumber wabah menggunakan sidik jari plasmid ('*plasmid finger printing*') sangat bermanfaat. Namun adanya transposon dengan kemampuan tinggi untuk berpindah dengan cepat, hal ini menjadikan kendala tersendiri dalam analisis hasil sidik jari plasmid (Farrar, 1984).

Insertion Sequence (IS) yang telah ditemukan sampai saat ini, mempunyai ukuran beragam antara 0,768 sampai 5,7 kb. *IS* pertama kali diketahui melalui kemampuannya melakukan transposisi atau insersi pada kromosom *Escherichia coli* sehingga berakibat perubahan sifat atau mutasi. *IS1* diketahui mudah melakukan insersi pada untai DNA yang kaya adenin dan timin. *IS* telah diketahui ada sekitar 15 jenis, di antaranya yang sering ada pada *Escherichia coli* adalah *IS1*, *IS2*, *IS3*, *IS4*, *IS30*. Setiap *IS* pada ujung-ujungnya terdapat rantai DNA dengan urutan saling berlawanan yang dikenal dengan nama '*Inverted Repeat*' (*IR*), kecuali pada *Tn9* yang urutannya searah yang disebut '*Direct Repeat*' (*DR*). Pada kromosom *Escherichia coli* telah diketahui ada beberapa jenis *IS*. Gambaran selintas beberapa *IS* ini dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Setiap *IS* minimal mengkode satu atau dua protein yaitu transposase dan protein kontrol untuk berfungsinya transposisi. Dua bagian utama DNA yang berperan pada transposisi disebut '*Open Reading Frame*' (*ORF*). Enzim transposase mempunyai tempat pengenalan ('*Recognition site*') pada DNA target maupun *IR* pada *IS* transposon tersebut (Bennett, 1992).

Transposon adalah gabungan antara *IS* dengan materi genetik yang dapat diamati pada ekspresi fenotipik, yang dapat berupa kekebalan terhadap antimikroba maupun logam berat. Hal ini menyebabkan transposon mempunyai kemampuan melakukan transposisi seperti *IS*, namun juga mampu mengkode sifat fenotipik seperti kekebalan terhadap antimikroba (Bennett, 1992).

Transposon dikenal ada dua jenis yakni: a). transposon komposit ('*Composite transposon*') dan b). transposon kompleks ('*Complex transposon*'). Transposon kompleks sering disebut 'transposon mirip *Tn3*' ('*Tn3 like transposon*'). Transposon komposit

ditandai dengan adanya materi genetik yang diapit oleh dua *IS* pada ujung-ujungnya, dimana *IS* tersebut sering dalam orientasi terbalik. Sedangkan transposon kompleks ditandai adanya materi genetik yang berada di dalam *IS* itu sendiri. Contoh transposon komposit maupun transposon kompleks dapat dilihat pada Gambar 2.4.

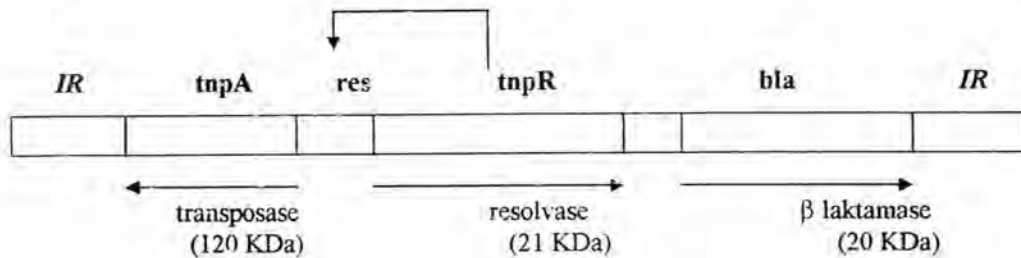
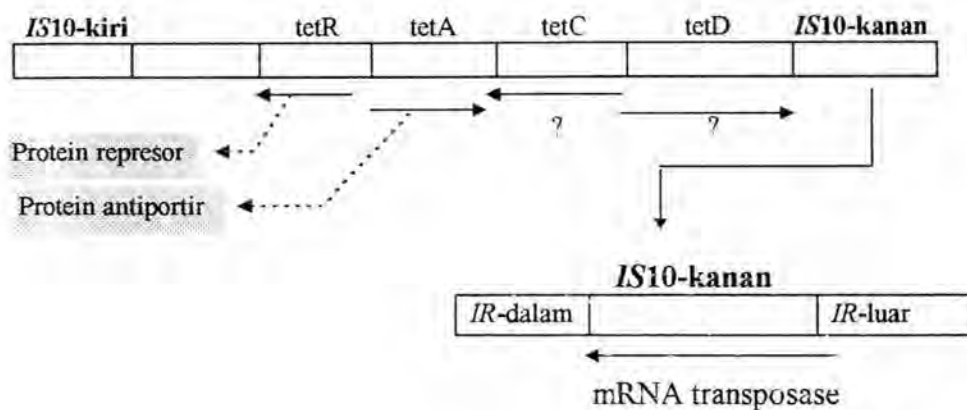
Tn3 mengandung gen *tnpA* yang mengkode enzim transposase dengan berat 120 KDa; *tnpR* mengkode protein represor dengan berat 21 KDa; dan gen *bla* yang mengkode enzim beta laktamase dengan berat 20 KDa. Protein represor ini dapat mengikat promoter pada titik *res* ('*Cointegrate resolution site*') sehingga proses transkripsi berhenti. Transposon yang lain adalah *Tn1* mengkode kebal ampisilin; *Tn5* mengkode kebal kanamisin, bleomisin dan streptomisin; *Tn10* mengkode kebal tetrasiklin; *Tn21* mengkode kebal merkuri; *Tn1721* mengkode kebal tetrasiklin; *Tn1681* mengkode produksi enterotoksin tahan panas (Bennett, 1992).

Tabel 2.2 'Insertion Sequence' (*IS*) yang ditemukan pada *Escherichia coli* K-12.
(Bennett, 1992).

Nama	Ukuran <i>IS</i> (bp)	Ukuran <i>IR</i> (bp)	Target(bp)	Jumlah <i>IS</i> pada		
				Kromosom E coli K-12	pF	pRI
<i>IS1</i>	768	20/23	9	4 - 10	0	2
<i>IS2</i>	1.327	32/41	5	4 - 13	1	0
<i>IS3</i>	1.400	32/38	3	5 - 6	2	0
<i>IS4</i>	1.426	16/18	11-13	1 - 2	?	?
<i>IS5</i>	1.195	15/16	4	10 - 11	?	?
<i>IS30</i>	1.221	23/26	?	2 - 8	?	0

Keterangan:

IR = 'Inverted Repeat'; *bp* = 'base pairs'; *pF* = plasmid *F*;
pRI = plasmid *RI*; * = 20 bp homolog diantara 23 bp pada *IR*;
? = Belum diketahui secara jelas.

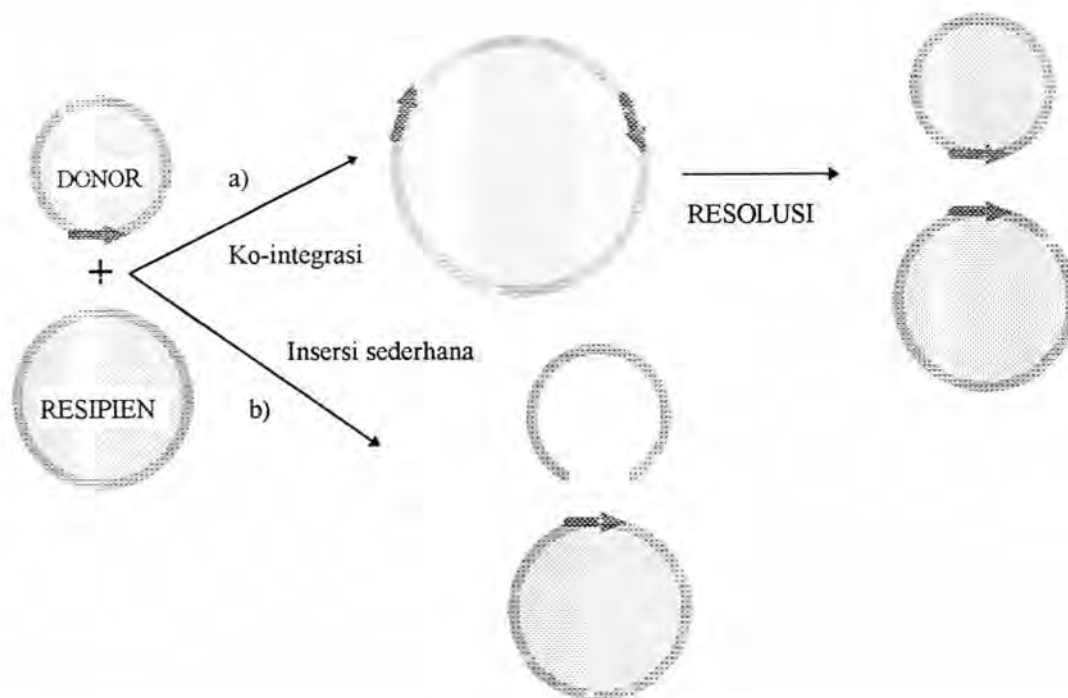
A: *Tn3* dalam plasmid *R1***B: *Tn10* dalam plasmid 222 (disebut juga plasmid *NRI*)****Gambar 2.4**

Struktur transposon kompleks (A) dan transposon komposit (B) (Bennett, 1992).

Keterangan:

tnpA=gen transposase; *tnpR*=gen represor; *res*='*Cointegrate resolution site*'; *bla*= gen beta laktamase; *tet*=gen tetrasiklin; *IR*='*Inverted repeat*'; ?=belum diketahui.

Inseri transposon pada DNA sasaran, terjadi melalui proses seperti pemutusan rantai DNA untai ganda oleh enzim restriksi yang berakibat terjadinya ekor ssDNA pada kedua sisi potongan dsDNA, kemudian diikuti penyambungan transposon pada kedua ujung ssDNA. Selanjutnya terjadi sintesis DNA pasangan pada kedua ssDNA menjadi dsDNA. Hal ini berakibat terjadinya duplikasi untai DNA pada kedua sisi tempat insersi, dengan urutan searah yang disebut '*Direct repeat*' (DR) (Bennett, 1992). Pada prinsipnya



Gambar 2.5.

Transposisi transposon secara replikatif (a) dan cara konservatif atau insersi sederhana (b) (Russel and Chopra, 1990).

Keterangan:



= transposon

DONOR

= DNA donor yakni plasmid atau kromosom yang mengandung transposon

RESIPIEN

= DNA resipien yakni plasmid atau kromosom yang menerima transposon

2.3 Epidemiologi Bakteri Kebal Antimikroba

Pada pemeriksaan bakteri flora tinja domba liar di Jepang, dari 283 domba yang diperiksa, hanya ada 2,5% domba yang mengandung bakteri *Escherichia coli* yang kebal terhadap antimikroba. Namun pada 37 domba liar yang ditangkap dan dipelihara di lingkungan penduduk, 97% domba mengandung bakteri kebal (Kinjo *et al.*, 1992).

ada dua cara transposisi transposon ke dalam DNA asing, yakni cara transposisi replikatif dan transposisi konservatif (Russel and Chopra, 1990). Transposisi replikatif terjadi melalui fusi dua replikon (salah satu mengandung transposon) sehingga menjadi satu DNA gabungan ('co-integrate'). Selanjutnya mengalami resolusi (pemisahan) menjadi dua untai DNA kembali dengan masing-masing mengandung elemen transposon. Sedangkan transposisi konservatif adalah insersi elemen transposon ke dalam DNA target, dan DNA donor dapat menghilang atau mengalami proses lain. Lihat Gambar 2.5.

Sampai kini belum pernah ditemukan adanya *IS* bebas dalam sel, namun diketahui pada *IS10* yang ekspresinya sangat tinggi, ditemukan adanya bentukan sirkuler dalam gabungan dengan protein. Bentukan ini diduga sebagai bentuk antara ('*Transposition intermediate*') (Bennett, 1992).

Pada terapi kloramfenikol terhadap 15 anak dari 107 anak di asrama, setelah 14 hari pengobatan, terjadi peningkatan jumlah anak yang mengandung bakteri kebal terhadap kloramfenikol. Pada anak yang mendapat terapi, terjadi peningkatan dari 8% menjadi 100% dari anak yang mengandung *Staphylococcus epidermidis* yang kebal terhadap kloramfenikol. Sedang pada anak yang tidak mendapat pengobatan, terjadi peningkatan dari 7% menjadi 58%. Peningkatan bakteri kebal ini juga terjadi terhadap antimikroba lain (kebal ganda), dimana pada kelompok anak yang mendapat terapi terjadi peningkatan dari 0% menjadi 93%, sedang pada kelompok yang tidak mendapat terapi terjadi peningkatan dari 6% menjadi 41% (Bentley *et al.*, 1970).

Pada bayi-bayi neonatus yang dirawat di ruang perawatan intensif sebuah rumah sakit di Florida Amerika Serikat, setelah keluar dari rumah sakit, sampai 12 bulan di rumah, 43% flora *Escherichia coli* pada neonatus tersebut mengandung plasmid kekebalan kanamisin. Sedang pada penelaahan dalam waktu 1 bulan, 3-4 bulan, 5-11 bulan setelah keluar rumah sakit, angka kejadian kekebalan kanamisin yang dikode plasmid adalah berturut-turut 82%, 80% dan 58%. Pada penelaahan anggota keluarga, ternyata 33% mengandung plasmid kekebalan kanamisin, sedangkan pada keluarga bayi-bayi sehat tidak ditemukan kekebalan kanamisin yang dikode plasmid (Damato *et al.*, 1974).

Pada suatu penelaahan infeksi oleh *Klebsiella pneumonia* penghasil enzim beta laktamase spektrum luas (*Extended Spectrum Beta Lactamase = ESBL*) pada suatu ruang perawatan intensif di rumah sakit, diketahui bahwa kejadian infeksi oleh *Klebsiella pneumonia* sangat berkaitan dengan adanya kolonisasi *Klebsiella pneumonia* di usus penderita. Setelah dilakukan pembatasan penggunaan antimikroba golongan beta laktam,

dalam waktu dua tahun terjadi penurunan yang bermakna, angka kejadian infeksi *Klebsiella pneumoniae* penghasil *ESBL* (Pena *et al.*, 1998).

2.4 Bakteri Koliform Flora Rumah Sakit

Bakteri koliform adalah bakteri batang negatif Gram keluarga *Enterobacteriaceae*, bersifat anaerobik fakultatif dan tidak berspora. Termasuk koliform adalah *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* dan *Klebsiella spp*. Bakteri ini mudah tumbuh pada media sederhana dan mempunyai daya tahan tinggi terhadap pengaruh sekitar. Bakteri ini biasanya sebagai flora usus manusia dan hewan, disamping banyak di lingkungan (Gallis, 1980). Di dalam air, dapat hidup beberapa bulan.

Rumah sakit adalah suatu sistem komunitas yang terdiri dari bangunan beserta isinya yang meliputi perangkat keras berupa alat-alat, lingkungan rumah sakit termasuk limbah rumah sakit dan sumber daya manusia yang meliputi dokter, paramedis dan staf yang lain. Disamping itu juga terdapat penderita yang dirawat di rumah sakit.

Penderita yang diberi antimikroba yang banyak diekskresi ke saluran cerna, seperti sefoperason dan seftriakson, cepat membunuh bakteri usus dalam 24 jam, dan dalam 5 sampai 8 hari kemudian muncul flora *Klebsiella*, *Enterobacter* dan juga *Pseudomonas* dan *Serratia* yang bersifat kebal ganda. Sedang pada pemberian sefotaksim yang hanya 5% diekskresi ke saluran cerna, tidak berakibat munculnya bakteri kebal ganda (Guggenbichler and Kofler, 1984). Matinya flora normal tubuh, dapat berakibat menurunkan Daya Tolak Kolonisasi (DTK) ('*Colonization Resistance = CR*') usus (van der Waaij, 1971; Itoh and Freter, 1989; van der Waaij, 1990;). Hal ini diikuti meningkatnya daya kolonisasi bakteri sekitar, salah satunya adalah bakteri koliform.

2.5 Antimikroba Golongan Cincin Beta Laktam

Golongan antimikroba yang mempunyai inti cincin beta laktam ada 4 kelompok yakni: a. penisilin yaitu cincin beta laktam dengan senyawa samping cincin tiazolidin; b. sefalosporin yaitu cincin beta laktam dengan senyawa samping cincin dihidrotiasin; c. monobaktam yaitu cincin beta laktam dengan senyawa samping sulfur; d. karbapenem yaitu cincin beta laktam dengan senyawa samping hidroksietil (Yao and Moellerring Jr, 1991).

Golongan penisilin meliputi bensil penisilin, metisilin, oksasilin, kloksasilin, ampisilin, amoksisilin, karbenisilin dan juga dikenal adanya penisilin semisintetik seperti meslosilin, aslosilin, piperasilin dan sulbenisilin. Struktur dan aktifitas sulbenisilin sangat mirip karbenisilin, setelah suntikan intra vena sekitar 80% dapat ditemukan dalam air kemih dalam bentuk aktif (Kucers and Bennet, 1982). Termasuk sefalosporin adalah sefalosporin generasi I yang meliputi sefasolin, sefalekssin, sefalotin; termasuk generasi II meliputi sefaklor, sefamandol, sefotiam, sefuroksin, sefoksitin; termasuk generasi III meliputi sefiksिम, sefotaksim, sefoperason, seftriakson (Yao and Moellerring Jr, 1991), dan sefdimir (Yamaguchi, 1995). Kini telah pula diperkenalkan sefalosporin generasi IV, seperti sefepim dan sefpirom, mempunyai aktifitas yang sangat baik terhadap bakteri positif Gram seperti sefalosporin generasi I dan II, dan terhadap bakteri negatif Gram seperti sefalosporin generasi III (Okamoto *et al.*, 1994).

Obat golongan penisilin bekerja dengan mengikat *PBP* yang berperan penting untuk sintesis peptidoglikan penyusun dinding sel bakteri. *PBP* adalah karboksipeptidase dan transpeptidase, yang merupakan enzim yang sangat diperlukan pada tahap akhir sintesis dinding sel bakteri (Dever and Dermody, 1991). Hal ini berakibat kematian bakteri

karena otolisis. Dikenal ada *PBP1*, *PBP2* dan *PBP3* yang sangat berperan pada sintesis dinding sel bakteri. Ketiga protein ini dapat diikat oleh antimikroba golongan cincin beta laktam, yang dapat berakibat lisis sel, perubahan bentuk sel dan hambatan pembelahan sel bakteri.

Ampisilin dan amoksisilin sangat baik diserap melalui usus, dan tersebar luas ke seluruh tubuh, kecuali otak dan cair otak. Pengeluaran dari tubuh terutama melalui ginjal, dan sekitar 30% - 50% ditemukan dalam air kemih dalam bentuk aktif (Flaherty and Gambertoglio, 1990).

Beberapa obat golongan sefalosporin juga diserap baik lewat usus, dan tersebar luas ke seluruh tubuh. Hal ini meliputi sefaleksin dan sefadroksil (generasi I). Sefaklor (generasi II) diserap lewat usus dalam jumlah sedang. Sefalosporin lain yang cukup baik diserap lewat usus adalah asam klavulanat dan sulbaktam (Flaherty and Gambertoglio, 1990). Dari golongan sefalosporin generasi III yang cukup baik diserap lewat usus adalah sefdimir (Yamaguchi, 1995). Pengeluaran utama dari tubuh adalah melalui ginjal, kecuali sefoperason melalui tinja.

Kekebalan terhadap obat golongan cincin beta laktam, dapat terjadi karena dihasilkannya enzim beta laktamase, perubahan sasaran titik tangkap obat dan perubahan protein pada lapisan luar dinding sel, sehingga mengganggu penembusan dan bekerjanya obat (Dever and Dermody, 1991). Kesemua ini dapat dikode oleh gen dalam kromosom maupun dalam plasmid.

Enzim beta laktamase bekerja dengan menghidrolisa ikatan amida pada cincin beta laktam sehingga menghasilkan produk bentuk asam yang tidak aktif (Rolinson, 1991). Dikenal ada banyak jenis enzim beta laktamase dengan spesifisitas yang khusus maupun

lebih umum. Dikenal pula adanya enzim esterase yang dapat merusak golongan sefalosporin, namun tidak terhadap golongan penisilin.

Pada bakteri *Haemophilus influenzae* yang kebal terhadap obat cincin beta laktam, diketahui tidak menghasilkan enzim beta laktamase. Pada bakteri ini ternyata dijumpai dua jenis *PBP*, yakni *PBP3a* dengan berat 65 Kilo Dalton (KDa) dan *PBP3b* dengan berat 63 KDa, yang ternyata afinitasnya rendah terhadap obat cincin beta laktam (Clairoux *et al.*, 1992). Telah ditemukan plasmid dengan berat 140 kb pada *Escherichia coli* yang mengkode kebal berbagai antimikroba, termasuk ampisilin dan tikarsilin (Jallat *et al.*, 1994). Kitzis *et al.* (1988) menemukan plasmid dengan ukuran 84 kb yang mengkode enzim beta laktamase, dan plasmid ini telah tersebar pada berbagai bakteri meliputi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus morgani* dan *Serratia marcescens*. Enzim ini selain dapat merusak golongan penisilin, juga dapat merusak golongan sefalosporin, seperti sefotaksim yang merupakan sefalosporin generasi 3.

2.6. Perkembangan Penelitian Plasmid Pengkode Kebal Antimikroba

Sejak ditemukannya plasmid kekebalan, berbagai penelitian terus berkembang. Telaah munculnya plasmid kekebalan dalam kaitan penggunaan antimikroba telah banyak laporan. Kebanyakan laporan mempunyai tujuan sama yakni melihat penyebaran secara epidemiologis bakteri kebal atau plasmid kekebalan, akibat penggunaan antimikroba. Sebagai indikator penelitian hampir selalu menggunakan flora pada tubuh manusia. Hal ini seperti pada penelitian Bentley *et al* (1970) menggunakan *Staphylococcus epidermidis* flora tenggorok; Damato *et al* (1974) dan Burman *et al* (1992) menggunakan indikator flora *Escherichia coli* neonatus yang dirawat di rumah sakit; Kinjo *et al* (1992) menggunakan *Escherichia coli* flora tinja sebagai indikator. Bahkan Pena *et al* (1998) menggunakan *Klebsiella pneumonia* baik penyebab infeksi maupun flora tubuh penderita di rumah sakit. Diketahui bahwa bakteri yang berada dalam suatu lingkungan akan menyebar ke sekitar melalui kolonisasi silang. Jika hal ini terjadi di rumah sakit, perpindahan dapat melalui kontak tangan petugas kesehatan dengan penderita dan benda di sekitarnya (Struelens, 1998). Meskipun penelitian ditujukan menganalisis bakteri lingkungan, namun belum ada peneliti yang secara optimal menggunakan bahan limbah sebagai sampel, padahal diketahui bahwa limbah rumah sakit adalah tempat terkumpulnya semua mikroba di lingkungan tersebut.

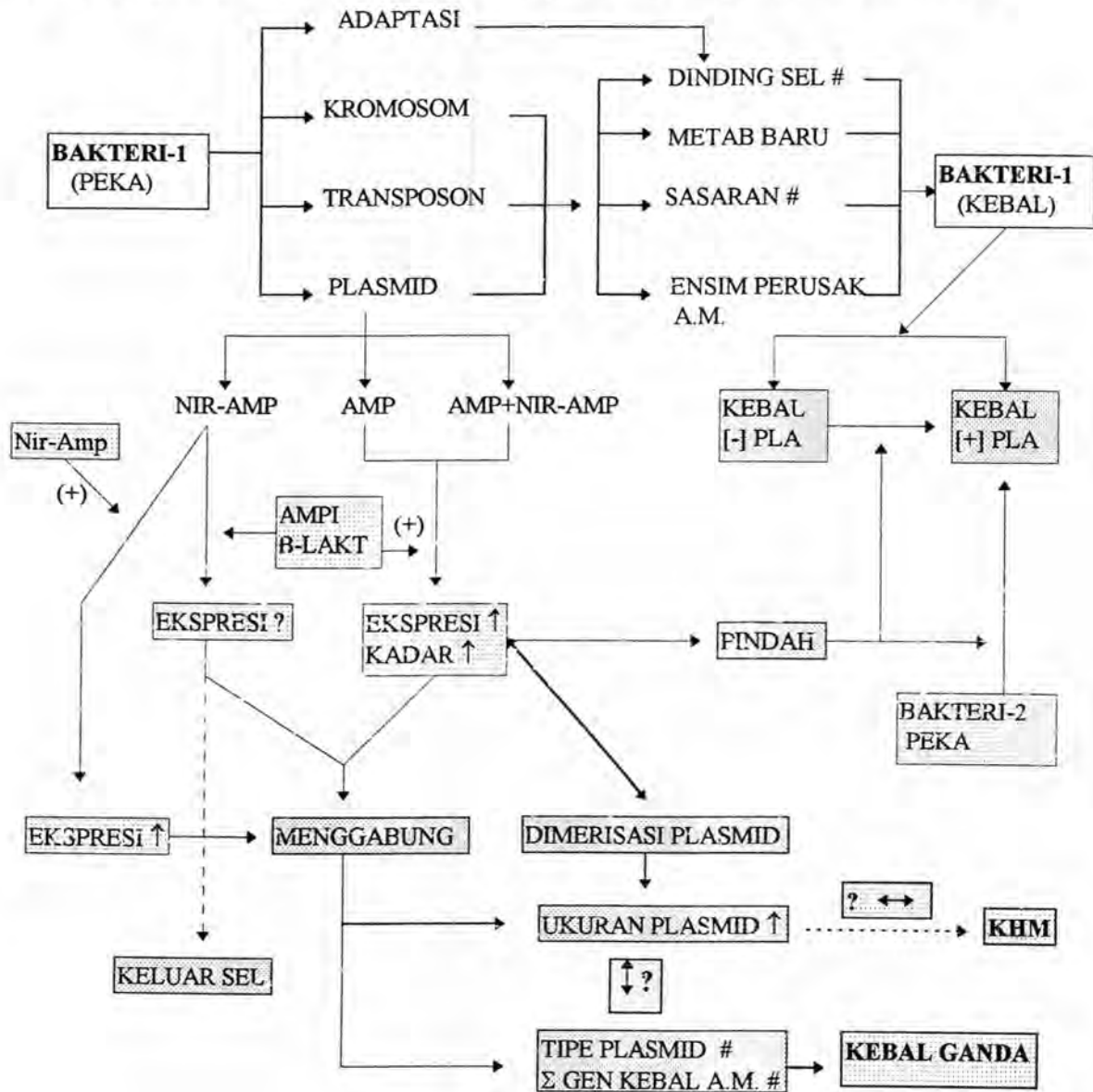
Di pihak lain, beberapa peneliti telah berhasil menemukan plasmid dengan berbagai ukuran dari kecil sampai besar (Tenover *et al*, 1987; Camphel and Mee, 1987; Kitzis *et al*, 1988; Jallat *et al*, 1984). Namun ukuran plasmid ini belum pernah dianalisis tersendiri dalam kaitan penggunaan antimikroba. Dua penelitian *in vitro* yang melakukan analisis dampak paparan antimikroba terhadap perubahan ukuran gen atau plasmid kebal

antimikroba adalah DeGuglielmo *et al* (1991) dan Normark *et al* (1977). Namun kejadian di lapangan belum pernah ada laporan.

Suatu peningkatan ekspresi plasmid pengkode kebal antimikroba yang disertai dengan peningkatan replikasi plasmid, beberapa laporan menunjukkan terjadinya peningkatan kompatibilitas plasmid dengan plasmid lain. Jika hal ini terjadi di alam atau rumah sakit, maka bisa diperkirakan bahwa akan berdampak munculnya kebal ganda.

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Peran Plasmid pada Terjadinya Kebal Antimikroba



Gambar 3.1 Kerangka konseptual terjadinya kekebalan pada bakteri.

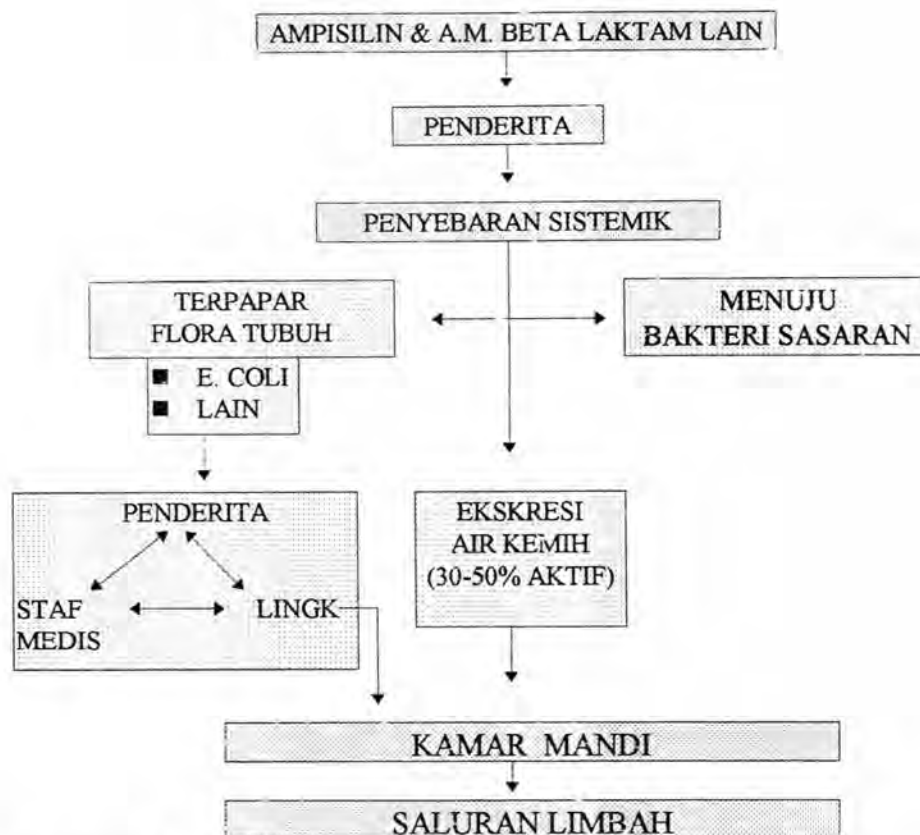
Keterangan:

- | | | | |
|---------|------------------------|---------|------------------------------------|
| A.M. | = antimikroba | [-] PLA | = Tidak mengandung plasmid |
| (+) | = meningkatkan | [+] PLA | = Mengandung plasmid |
| # | = berubah atau berbeda | Σ | = Jumlah |
| AMP | = Ampisilin | B-LAKT | = Antimikroba golongan beta laktam |
| NIR-AMP | = bukan Ampisilin | ↑↓? | atau ↔? = Hubungan belum jelas |
| KHM | = Kadar Hambat Minimal | ↔? | |

Penjelasan gambar 3.1.

- a. Banyaknya penggunaan antimikroba dalam suatu lingkungan, mengakibatkan peningkatan jumlah bakteri kebal.
- b. Kekebalan bakteri terhadap antimikroba, dapat melalui empat cara yakni: 1). secara ensimatik, merusak antimikroba sehingga menjadi tidak aktif, 2). merubah reseptor titik tangkap antimikroba sehingga antimikroba tidak dapat bekerja, 3). antimikroba sulit masuk ke dalam sel bakteri karena perubahan struktur dinding sel bakteri, atau kalau sudah masuk cepat keluar dari sel bakteri, sehingga obat tidak dapat mencapai kadar yang cukup untuk bekerja di sasaran; 4). dibentuknya jalur metabolisme baru sehingga tidak dikenal oleh antimikroba..
- c. Terjadinya kekebalan dapat berdasarkan adaptasi akibat perubahan fisiko-kimiawi pada sel bakteri, khususnya perubahan struktur dinding sel sehingga mengganggu transportasi antimikroba melalui dinding sel bakteri. Adaptasi ini terutama melalui perubahan ekspresi gen akibat pengaruh lingkungan, dengan akibat perubahan ekspresi gen protein pengatur sistem transportasi pada sel bakteri, khususnya protein porin.
- d. Kekebalan yang terjadi melalui perubahan genetik, dapat bersifat kromosomal yaitu dikode oleh gen yang ada dalam kromosom, atau dapat juga dikode oleh plasmid yang merupakan gen ekstrakromosomal. Selain itu ada yang dikode oleh transposon yang selain dapat masuk ('insersi') ke dalam plasmid, dapat juga masuk dalam kromosom.
- e. Suasana antimikroba dalam kadar sub-lethal dapat meningkatkan perpindahan plasmid pengkode kekebalan terhadap antimikroba yang bersangkutan. Adanya paparan antimikroba kadar sub-lethal, dapat meningkatkan ekspresi plasmid. Ekspresi plasmid mempunyai dua makna, yakni: 1). Gen dalam plasmid melakukan transkripsi dan

- dilanjutkan dengan translasi untuk membentuk protein fenotipik; 2). Plasmid melakukan replikasi sehingga jumlah plasmid menjadi lebih banyak. Kadar plasmid yang lebih tinggi, bisa berakibat salah satu atau lebih dari tiga hal berikut ini: a). Plasmid menjadi makin mudah pindah ke bakteri lain di sekitarnya; b). Pada paparan antimikroba yang berkelanjutan, akan berakibat terjadinya dimerisasi (= penggabungan) plasmid sejenis sehingga ukuran plasmid menjadi makin besar seperti deret hitung; c). Plasmid menjadi lebih kompatibel dengan plasmid lain yang berada bersama dalam satu sel bakteri, namun diketahui pula adanya plasmid lain yang malah keluar dari sel. Hal ini sangat dipengaruhi oleh derajat inkompatibilitas plasmid.
- f. Plasmid dapat pindah antar bakteri melalui tiga cara yakni: 1). konjugasi yaitu perpindahan plasmid melalui 'perkawinan' (penempelan antara dua bakteri), dan plasmid pindah melalui saluran penghubung yang disebut pili seksual; 2). transformasi yaitu bahan genetik yang lepas ke medium, masuk ke dalam sel bakteri lain melalui dinding sel; 3). transduksi yaitu perpindahan plasmid melalui perantara virus.
- g. Adanya paparan antimikroba selain golongan beta laktam, akan meningkatkan ekspresi plasmid pengkode antimikroba yang bersangkutan. Hal ini akan makin mempermudah terjadinya penggabungan dengan plasmid pengkode kebal ampisilin.
- h. Hubungan antara ukuran plasmid dengan KHM sampai saat ini belum jelas
- i. Adanya gen nir-ampisilin yang ikut bergabung dalam plasmid pengkode kebal ampisilin, akan berakibat munculnya bakteri kebal ganda (*Multiple resistance*)
- j. Perjalanan pencemaran ampisilin maupun obat golongan beta laktam secara umum bisa dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2

Bagan alir pencemaran ampisilin atau antimikroba golongan beta laktam yang lain, di lingkungan rumah sakit.

Keterangan:

LINGK = Lingkungan sekitar
A.M. = Antimikroba

Penjelasan gambar 3.2

- Antimikroba (golongan penisilin) yang diberikan pada seorang penderita akan menyebar ke seluruh tubuh, kecuali ke cair otak.
- Antimikroba dikeluarkan dari tubuh terutama melalui saluran air kemih. Sejumlah 30-50% di keluarkan dalam air kemih dalam bentuk aktif. Mengingat segala kegiatan pembuangan air kemih dilakukan di kamar mandi, maka pencemaran antimikroba akan sampai pada saluran buangan kamar mandi.

- c. Di dalam tubuh, antimikroba akan menuju bakteri sasaran. Namun tidak bisa dihindari akan terpapar dengan flora tubuh, salah satunya adalah flora *Escherichia coli*. Hal ini berakibat terjadinya peningkatan kekebalan bakteri.
- d. Di dalam ruang perawatan rumah sakit, flora tubuh akan saling berpindah antara penderita, staf dan lingkungan rumah sakit. Karena segala kegiatan kebersihan dilakukan di kamar mandi atau berakhir dengan pembuangan limbah cair ke kamar mandi, maka flora inipun akan terkumpul di tempat tersebut termasuk saluran pembuangannya.

3.2 Hipotesis Penelitian

- a. Plasmid pengkode kebal antimikroba lebih banyak terjadi pada lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi dibanding lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah.
- b. Plasmid pengkode kebal antimikroba yang dipisahkan dari lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi mempunyai ukuran rata-rata lebih besar dibanding plasmid yang dipisahkan dari lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah.
- c. Tipe plasmid pengkode kebal antimikroba yang dipisahkan dari lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang tinggi, **berbeda** terhadap tipe plasmid yang dipisahkan dari lingkungan dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Pendekatan Penelitian

Penelitian dilakukan secara observasional-analitik dengan pendekatan Cross Sectional. Pada pendekatan 'Cross Sectional', dilakukan pengumpulan sampel limbah cair dari tempat penelitian yakni ruang rawat inap Bedah Urologi dan ruang rawat inap Kedokteran Jiwa RSUD Dr Soetomo Surabaya. Pada waktu bersamaan, dilakukan pemisahan *Escherichia coli* dari sampel-sampel tersebut. Selanjutnya dari bakteri yang telah dipisahkan tersebut, dilakukan uji kepekaan terhadap ampisilin. Maka akan diperoleh hasil *Escherichia coli* dari kedua tempat yang kebal atau peka terhadap ampisilin.

Pada bakteri yang telah diketahui kebal terhadap ampisilin, dilakukan uji transformasi pada bakteri acuan (*Escherichia coli* kompeten dari galur DH5 α). Selanjutnya pada hasil transformasi positif dilakukan analisis lebih lanjut terhadap sifat plasmid.

4.2 Tempat Penelitian dan Pengambilan Sampel

4.2.1 Tempat penelitian

Sebagai tempat penelitian dipilih ruang rawat inap pada UPF Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Sebagai kontrol untuk tempat dengan tingkat penggunaan antimikroba yang rendah, dipilih ruang rawat inap pada UPF Kedokteran Jiwa RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

4.2.2 Pengambilan sampel penelitian

Sampel penelitian adalah limbah cair buangan sepanjang saluran yang berasal dari kamar mandi yang diambil dari 'lingkungan1' (UPF BU) dan lingkungan2 (UPF IKJ). Hal ini karena kamar mandi merupakan tempat utama penderita membuang air kemih, sedangkan 30-40% ampisilin yang diminum penderita dikeluarkan melalui air kemih dalam bentuk aktif. Karena itu, diharapkan paparan antimikroba ampisilin terhadap flora lingkungan, khususnya *Escherichia coli* pada limbah cair buangan kamar mandi akan tinggi. Disamping hal diatas, adanya kolonisasi bakteri lingkungan pada tubuh penderita akan terbilas saat mandi dan terbang ke saluran pembuangan limbah kamar mandi.

4.3 Tingkat Penggunaan Antimikroba di Lokasi Penelitian

Tingkat pengaruh antimikroba didasarkan pada dua hal yakni: 1). berapa prosen penderita rawat inap di lokasi penelitian yang mendapat pengobatan ampisilin ; 2). berapa dosis rata-rata ampisilin (dalam miligram) per penderita. Pencatatan penggunaan antimikroba dilakukan setiap hari selama tiga bulan, dengan cara mencatat setiap antimikroba yang diberikan pada penderita dan tercatat dalam buku penderita rawat inap.

Perbedaan pengaruh dianalisis secara statistik dengan uji khi kuadrat untuk ad. 1) dan uji t bebas untuk ad. 2). Pengaruh antimikroba dikatakan lebih tinggi jika dua parameter di atas lebih besar.



4.4 Populasi, Sampel Penelitian dan Besar Sampel

4.4.1 Populasi

Sebagai populasi target adalah flora *Escherichia coli* yang ada di lingkungan penelitian. Sedangkan populasi sampel adalah *Escherichia coli* yang dipisahkan dari limbah cair buangan kamar mandi di lokasi penelitian.

Sampel limbah diambil sebanyak 2 sampai 3 kali setiap minggu, dengan jumlah 3 sampai 4 sampel tiap pengambilan. Dari setiap sampel, dibiakkan di laboratorium dan dipisahkan bakteri *Escherichia coli*, sehingga akan terkumpul *Escherichia coli* sejumlah yang disyaratkan pada perhitungan jumlah sampel (butir 4.4.2.3).

4.4.2 Sampel penelitian

4.4.2.1 Unit analisis

Sebagai unit analisis pada penelitian tersebut adalah flora *Escherichia coli* yang dipisahkan dari sampel yang diambil dari lingkungan penelitian.

Escherichia coli dipakai sebagai petunjuk paparan terhadap berbagai antimikroba karena beberapa alasan yakni:

- a. Flora normal dari golongan koliform pada manusia, selalu dijumpai adanya *Escherichia coli*.
- b. *Escherichia coli* mempunyai habitat utama dalam usus manusia dan hewan, juga pada permukaan tubuh terutama sekitar anus. Bakteri ini juga banyak ditemukan pada lingkungan sekitar manusia, termasuk limbah cair di lingkungan sekitarnya.
- c. *Escherichia coli* mempunyai daya tahan hidup yang relatif tinggi pada berbagai tempat, termasuk lingkungan sekitar.

- d. Berkaitan dengan keberadaan *Escherichia coli* dalam usus manusia, permukaan luar (kulit) tubuh manusia maupun pada lingkungan atau limbah sekitar, maka setiap konsumsi antimikroba oleh seseorang, hampir selalu terjadi juga paparan antimikroba dengan flora *Escherichia coli*.
- e. Selain sebagai flora normal, ternyata *Escherichia coli* sering juga menjadi penyebab penyakit infeksi pada manusia, baik infeksi nosokomial maupun infeksi bukan nosokomial.
- f. Telah banyak ditemukan adanya plasmid kekebalan berada dalam bakteri *Escherichia coli*.

4.4.2.2 Cara pengambilan sampel

Sampel diambil dengan menggunakan semprit steril isi 5 mililiter, diambil sebanyak 5 ml sampel limbah cair di beberapa tempat berbeda di saluran buangan kamar mandi. Sampel langsung dibawa ke Laboratorium Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikrobiologis. Sampel dikumpulkan secara bergantian antara kedua lokasi penelitian. Pada setiap sampel limbah diambil sebanyak 3 galur *Escherichia coli* sampai diperoleh sejumlah sampel yang disyaratkan

4.4.2.3 Besar sampel penelitian

Penelitian tersebut adalah membandingkan proporsi kekebalan *Escherichia coli* antara dua tempat. Maka dapat menggunakan rumus 4.1. (Snedecor & Cochran, 1980). Berdasar rumus 4.1, perlu diketahui perkiraan proporsi kekebalan *Escherichia coli* di kedua lokasi penelitian (p_1 dan p_2).

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

Rumus 4.1

Rumus cara menghitung besar sampel (n) untuk uji banding proporsi dua kelompok.

Keterangan: n = besar sampel tiap perlakuan; Z = Indeks Standard penyimpangan

α = tingkat kesalahan; β = kuat uji ('Power')

p1= proporsi kekebalan di tempat penelitian-1

p2= proporsi kekebalan di tempat penelitian-2

q1= 1-p1 q2 = 1 - p2

Penelitian tersebut menggunakan tingkat kesalahan 5% satu ekor dengan kuat uji 90%. Maka angka $(Z\alpha + Z\beta)^2 = 8,6$. Hal ini dapat dilihat Tabel 4.1.

Pada penelitian pendahuluan tentang adanya plasmid pengkode kebal ampisilin pada *Escherichia coli* dari isolat yang berasal UPF IKJ dan UPF BU, telah dilakukan pada 12 sampel limbah cair rumah sakit dari masing-masing lokasi penelitian. Dari 12 sampel telah dipisahkan 3 sampel tiap sampel sehingga terkumpul sebanyak 36 *Escherichia coli* pada tiap lokasi penelitian. Pada pemeriksaan kekebalan terhadap ampisilin cara pengenceran agar, diperoleh hasil 30 galur *Escherichia coli* dari UPF IKJ kebal ampisilin dan dari UPF BU didapatkan 32 galur kebal ampisilin. Pada uji transformasi dari isolat plasmid dari masing-masing bakteri kebal ampisilin, 7 galur dari 30 galur kebal ampisilin yang berasal dari UPF IKJ diketahui mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin. Sedangkan 12 galur *Escherichia coli* dari 32 galur kebal ampisilin yang berasal dari UPF BU, mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin. Jika angka kejadian plasmid tersebut dihitung dari jumlah total isolat *Escherichia coli* dari kedua lokasi penelitian, maka

19,44% isolat *Escherichia coli* dari UPF IKJ mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin, sedangkan dari UPF BU ada 33,33%. Berdasar hasil ini maka jumlah sampel penelitian dapat dihitung menggunakan rumus 4.1., sehingga $n = 168,86$. Berdasar pemikiran ini peneliti mengambil sampel limbah cair rumah sakit sebanyak 70 sampel dari masing-masing lokasi, dan setiap sampel dipisahkan sebanyak 3 galur *Escherichia coli*, sehingga jumlah total sampel adalah 210 galur *Escherichia coli*.

Tabel 4.1

Angka pengali ('Multiplier') dari pada σ^2/δ^2 untuk sampel berpasangan, dan $2\sigma^2/\delta^2$ pada sampel bebas, yang dibutuhkan untuk menentukan besar masing-masing sampel.

Kuat uji (Power)	Tingkat kemaknaan (Dua ekor)			Tingkat kemaknaan (Satu ekor)		
	1%	5%	10%	1%	5%	10%
80%	11,7	7,9	6,2	10	6,2	4,5
90%	14,9	10,5	8,6	13	8,6	6,6
95%	17,8	13	10,8	15,8	10,8	8,6

Keterangan: $2\sigma^2 = (p1.q1 + p2.q2)$ pada rumus 4.1.

Angka pengali = $(Z\alpha + Z\beta)^2$ pada rumus 4.1.

4.5 Tempat Pemeriksaan

Pemeriksaan mikrobiologis dan uji kepekaan, serta pemisahan plasmid pengkode kebal ampisilin, dilakukan di Laboratorium TDC Universitas Airlangga dan dengan bantuan Laboratorium Biokimia, Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4.6 Pemeriksaan Mikrobiologis

Pemisahan dan pemeriksaan *Escherichia coli* menurut cara (Baron *et al.*, 1994; Munro, 1992). Tiap sampel ditanam pada media *Eosin Methylen Blue* (EMB), setelah dieramkan 37 °C suasana aerobik selama 18 jam, diambil 5 koloni yang berbentuk bulat ukuran sekitar 1-2 milimeter, serta bersifat laktosa positif dan berwarna kilap logam. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kepastian dengan uji TSI (*Triple Sugar Iron*); IMViC (Indol, Metil merah, Voges-Proskauer, Penggunaan sitrat); uji urease dan motilitas, sampai terdiagnosis spesies *Escherichia coli*. Tata cara pemeriksaan aglutinasi, biokimiawi dan motilitas dapat dilihat pada Lampiran 2. Spesies *Escherichia coli* ditegakkan berdasar hasil berikut ini: TSI (Slant: Asam; Butt: asam, ada gas, tidak ada H₂S); Indol (positif); MR (positif); VP (negatif); Pemakaian sitrat (negatif); motilitas (positif); produksi urease (negatif) dan aglutinasi (positif). Penjelasan hasil positif dan negatif ada di Lampiran 2. Untuk kepastian diagnosis, dilakukan dengan uji aglutinasi menggunakan antisera polivalen terhadap *Escherichia coli*. Dipergunakan antisera buatan BioFarma Bandung. Pemeriksaan dilanjutkan dengan uji kepekaan terhadap ampisilm, menurut cara baku dari NCCLS dengan modifikasi (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*) (Baron *et al.*, 1994; Sahm and Washington, 1991)). Tiap sampel limbah dipisahkan 3 galur *Escherichia coli* sebagai unit analisis.

4.7 Uji Kepekaan Cara Pengenceran Agar

Cara ini dipilih karena pada uji-uji selanjutnya, misalnya pada uji seleksi kepindahan kekebalan, dilakukan pada media agar yang mengandung antimikroba yang diuji.

Antimikroba uji dipersiapkan dalam bentuk larutan simpanan (*'Stock solution'*) dengan kadar 64 miligram per mililiter akuades.

Sebagai media uji adalah media agar MH (*'Mueller Hinton'*) yang dibuat menurut petunjuk pabrik. Antimikroba ditambahkan saat agar masih cair, sebelum dituang ke lempeng petri. Tiap lempeng petri diisi 20 ml agar MH (Sahm and Washington II, 1991). Kadar antimikroba yang dipakai sebagai petunjuk kekebalan pada uji tersebut adalah 16 mikrogram per ml ampisilin. Hal ini sesuai dengan batas kadar bunuh minimal yang disepakati. Bakteri dikatakan kebal jika tumbuh pada media yang mengandung ampisilin kadar 16 mikrogram per mililiter atau lebih. Cara ini seperti juga yang dilakukan Tullus et al (1990) untuk menentukan kekebalan *Escherichia coli* flora tinja neonatus.

Persiapan inokulum dilakukan dengan membiakkan bakteri sampel pada media cair Mueller Hinton, dieramkan suhu 37 C semalam. Selanjutnya diencerkan dengan garam faali (NaCl 0,85%) sampai kekeruhan setara dengan standard McFarland 0,5 yang berarti mengandung bakteri sebanyak 10^8 per mililiter. Selanjutnya diencerkan lagi 10 kali. Sebagai inokulum adalah sebanyak 2 mikroliter suspensi bakteri.

Sebagai kontrol kualitas dipergunakan *Escherichia coli* galur ATCC25922. Metode dianggap tepat dan baik jika dengan cara yang sama, diperoleh KHM (Kadar Hambat Minimal) terhadap ampisilin adalah 2-8 mikrogram per ml. Hal ini sesuai dengan ketentuan NCCLS (Sahm and Washington II, 1991).

4.8 Pemeriksaan Kekebalan Dikode Plasmid

4.8.1 Isolasi plasmid dari *Escherichia coli* sampel

Untuk melakukan transformasi, plasmid harus dipisahkan dahulu dari sel bakteri, dengan cara menghancurkan sel bakteri. Dipergunakan cara alkali ('Lysis by Alkali') (Sambrook *et al.*, 1989). Prinsip cara ini ada dua tahap yakni: 1). Persiapan biakan bakteri; 2). penghancuran bakteri dengan cara kimiawi untuk memisahkan plasmid.

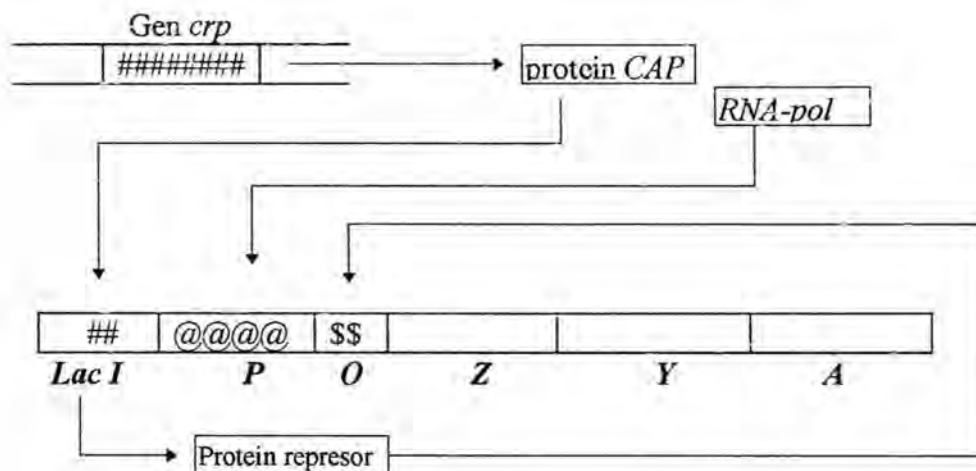
Bakteri dibiakkan pada media cair Luria Bertani (LB) dan dieramkan suhu 37 C semalam. Diambil 1 ml suspensi biakan dan ditampung dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya dilakukan pemisahan plasmid menurut cara baku. (Sambrook *et al.*, 1989). Prinsip pemisahan plasmid cara alkali adalah dinding sel bakteri dihancurkan dengan larutan alkali, setelah dilakukan pemusingan, supernatan yang berisi plasmid dipisahkan. Plasmid dipresipitasi menggunakan etanol dengan pemusingan kecepatan tinggi (12.000 rpm). Cara kerja secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.2 Transformasi plasmid pada *Escherichia coli* kompeten ('Competent *Escherichia coli*')

Tahap ini meliputi: 1). Penyiapan *Escherichia coli* kompeten, sebagai penerima (resipien) atau penangkap plasmid; 2). Transformasi plasmid ke dalam *Escherichia coli* kompeten dan uji ekspresi kekebalan terhadap ampisilin pada media LB.

4.8.2.1 Penyiapan *Escherichia coli* kompeten ('Competent *Escherichia coli*') sebagai penangkap plasmid ('Recipient')

Escherichia coli kompeten adalah *Escherichia coli* acuan sebagai penerima ('recipient') yang diolah secara kimiawi sehingga mudah menangkap plasmid bebas. Dipergunakan *Escherichia coli* galur **DH5 α** yang dikenal efisien menangkap plasmid pada uji transformasi (Sambrook *et al.*, 1989; Miller, 1992). Bakteri ini diketahui mempunyai defek pada gen *lac* sehingga tidak mampu mendegradasi laktosa. Jika dibiakkan pada media MacConkey, maka koloni akan berwarna putih atau tidak berwarna, berbeda dengan *Escherichia coli* sampel yang berwarna merah. Ini bermanfaat pada saat konfirmasi sel transforman hasil uji transformasi. Sel transforman yang betul adalah bersifat kebal ampisilin, dan jika dibiakkan pada media MacConkey akan berwarna putih. Gambaran gen *lac* secara skematis dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1

Struktur gen *Lac* pada *Escherichia coli* (Miller, 1992)

Keterangan: *crp* = gen *crp* pengkode protein CAP,

Lac I, P, O, Z, Y, A = gen *Lac-operon*

CAP = 'Catabolic Activator Protein'

Tatacara pembuatan sel kompeten dilakukan menurut cara baku dengan cara mencuci bakteri menggunakan CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989; Nakata, 1997). Tata-cara selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.2.2 Transformasi plasmid pada *Escherichia coli* kompeten dan uji seleksi

Uji ini ditujukan memasukkan plasmid ke *Escherichia coli* kompeten. Selanjutnya diberikan media dan pengeraman khusus untuk ekspresi plasmid kekebalan terhadap ampisilin. Semua dilakukan menurut cara baku (Sambrook *et al.*, 1989; Nakata *et al.*, 1997).

Seleksi dilakukan pada media yang mengandung ampisilin kadar 64 mikrogram per mililiter. Adanya pertumbuhan bakteri pada media seleksi, menunjukkan adanya perubahan *Escherichia coli* kompeten dari peka menjadi kebal, yang berarti ada plasmid kekebalan yang masuk. Kontrol pertumbuhan dilakukan dengan menanam bakteri kompeten tanpa transformasi pada media seleksi, sedangkan kontrol transformasi positif dilakukan dengan melakukan transformasi *pBR322* pada sel kompeten. Plasmid *pBR322* adalah plasmid yang diketahui mengandung gen pengkode kebal ampisilin dan tetrasiklin. Pada setiap melakukan uji transformasi plasmid sampel, selaiu disertai transformasi *pBR322* dan hasil seleksi transforman *pBR322* harus positif. Sebagai media seleksi sebenarnya dapat menggunakan media MacConkey atau Luria Bertani. Namun dalam penelitian ini dipergunakan media Luria Bertani (LB). Hal ini sesuai dengan protokol oleh Nakata *et al.*, (1997), dan juga dari penelaahan pendahuluan oleh peneliti diketahui bahwa penggunaan media LB lebih efisien dibanding media MacConkey. Hasil penelitian pendahuluan tersebut menunjukkan bahwa hasil transformasi pada media LB mendapatkan

jumlah sel transforman dua kali lebih banyak dibanding pada media MacConkey (Kuntaman, 1999).

Cara kerja secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.8.3 Visualisasi dan peneraan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin

Pada semua sel transforman, dilakukan isolasi plasmid menurut cara baku dengan cara lisis alkali (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid dielektroforese pada agarose 0,8% dengan bufer elektroforese adalah TBE 0,5 X (Tris-Boric acid-EDTA kekuatan 0,5 kali). Sebagai alat penera ('marker') ukuran plasmid, dipergunakan *lambdaHindIII* dengan ukuran tertinggi adalah 23.130 bp dan terendah 125 bp. Ukuran marker secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.7. Elektroforese dijalankan dengan voltase 100 volt dan membutuhkan waktu selama 1 jam. Potongan DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke kutub positif elektroforese, dengan kecepatan berbanding terbalik dengan ukurannya. Selanjutnya agarose dicat dengan etidium bromide 50 ng% (10 mikroliter larutan 1% dalam 200 ml akuades) dalam akuades selama 30 menit dan difoto dengan kamera polaroid menggunakan film hitam putih. Hasilnya adalah pita-pita DNA yang dapat diamati sebagai pita putih dengan latar beiakang hitam. Ukuran DNA dapat diperkirakan berdasar kesetaraan kedudukannya terhadap pita DNA marker. DeGuglielmo *et al* (1991) untuk melihat plasmid ukuran sampai 36 Mda (=36.000 Kda = \pm 70 kb) menggunakan agarose 0,8%.

4.8.4 Penentuan ekspresi gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin sebagai penyerta gen pengkode kebal ampisilin pada sel transforman

Semua sel transforman telah diketahui kebal ampisilin. Untuk melihat adanya gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin, perlu dilakukan uji ekspresi kekebalan terhadap berbagai antimikroba. Untuk itu pada semua sel transforman dilakukan uji kepekaan terhadap beberapa antimikroba dengan cara difusi cakram. Tata cara uji kepekaan dilakukan berdasar ketentuan *NCCLS* (Munro, 1992; Sahm and Washington II, 1991). Sebagai pedoman penentuan kepekaan hasil uji, ditentukan berdasar diameter daerah hambatan berdasar ketentuan standard, seperti Tabel 4.2. Cara selengkapnya lihat pada Lampiran 2.

Tabel 4.2

Jenis antimikroba uji dan pedoman penentuan kekebalan pada uji kepekaan cara difusi cakram terhadap sel transforman

Jenis Antimikroba	Lebar daerah hambatan (mililimeter) sebagai pedoman pembacaan kekebalan		
	Kebal (\leq)	Intermediate	Peka (\geq)
1. Ampisilin (AMP10)	13	14-16	17
2. Eritromisin (E15)	13	14-17	18
3. Kloramfenikol (C30)	12	13-17	18
4. Kanamisin (K30)	13	14-17	18
5. Sefaleksin (CL30)	14	15-17	18
6. Sefotaksim (CTX30)	14	15-22	23
7. Sefotiam (CTM30)	14	15-17	18
8. Sulbenisilin (SUL100)	13	14-17	18
9. Tetrasiklin (TE30)	14	15-18	19
10. Trimetoprim (W5)	13	14-15	16

Sebagai antimikroba uji, dipilih 10 cakram antimikroba yang golongannya mencakup sejumlah antimikroba yang dipergunakan di lokasi penelitian dan yang telah dikenal bahwa kebal terhadap antimikroba yang bersangkutan telah dilaporkan dikode

oleh plasmid (Cooksey, 1991). Lihat Tabel 4.3. Antimikroba ini meliputi golongan cincin beta laktam (ampisilin, sulbenisilin, sefaleksin, sefotiam, sefotaksim), eritromisin, kloramfenikol, aminoglikosida (kanamisin), tetrasiklin dan trimetoprim.

Tabel 4.3

Mekanisme kerja dan peran gen kebal pada beberapa antimikroba

Antimikroba	Mekanisme utama kekebalan	Jenis gen yang berperan
Beta laktam	Perusakan oleh enzim	P, K, Tn
Makrolid	Perubahan sasaran obat	P, K, Tn
Kloramfenikol	Perusakan oleh enzim	P, Tn
Aminoglikosida	Perusakan oleh enzim	P, K, Tn
Tetrasiklin	Perubahan sasaran obat, dan Efluks	P, K, Tn
Trimetoprim	Perubahan sasaran obat	P, K, Tn

Keterangan: P=Plasmid; K=Kromosom; Tn=Transposon

4.9 Variabel, Parameter dan Analisis Statistik

4.9.1 Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah tingkat penggunaan ampisilin di lokasi penelitian. Pengamatan dilakukan dengan cara survei penggunaan ampisilin pada penderita rawat inap di lokasi penelitian. Sebagai parameter adalah: a). Prosen penderita rawat inap yang mendapat ampisilin. Skala nominal dan uji statistik menggunakan uji khi kuadrat; b). Dosis (gram) ampisilin (atau antimikroba beta laktam) rata-rata per penderita, yang diberikan pada penderita rawat inap. Skala rasio dan analisis statistik menggunakan uji t bebas.

4.9.2 Variabel tergantung

4.9.2.1 Pola kekebalan

Pola kekebalan dinyatakan *Escherichia coli* yang peka atau kebal terhadap ampisilin. Skala nominal dan analisis statistik menggunakan uji khi kuadrat.

4.9.2.2 Pola kekebalan yang dikode plasmid

Pola kekebalan yang dikode plasmid adalah kekebalan yang dikode dan yang tidak dikode plasmid. Skala nominal dan analisis statistik menggunakan uji khi kuadrat.

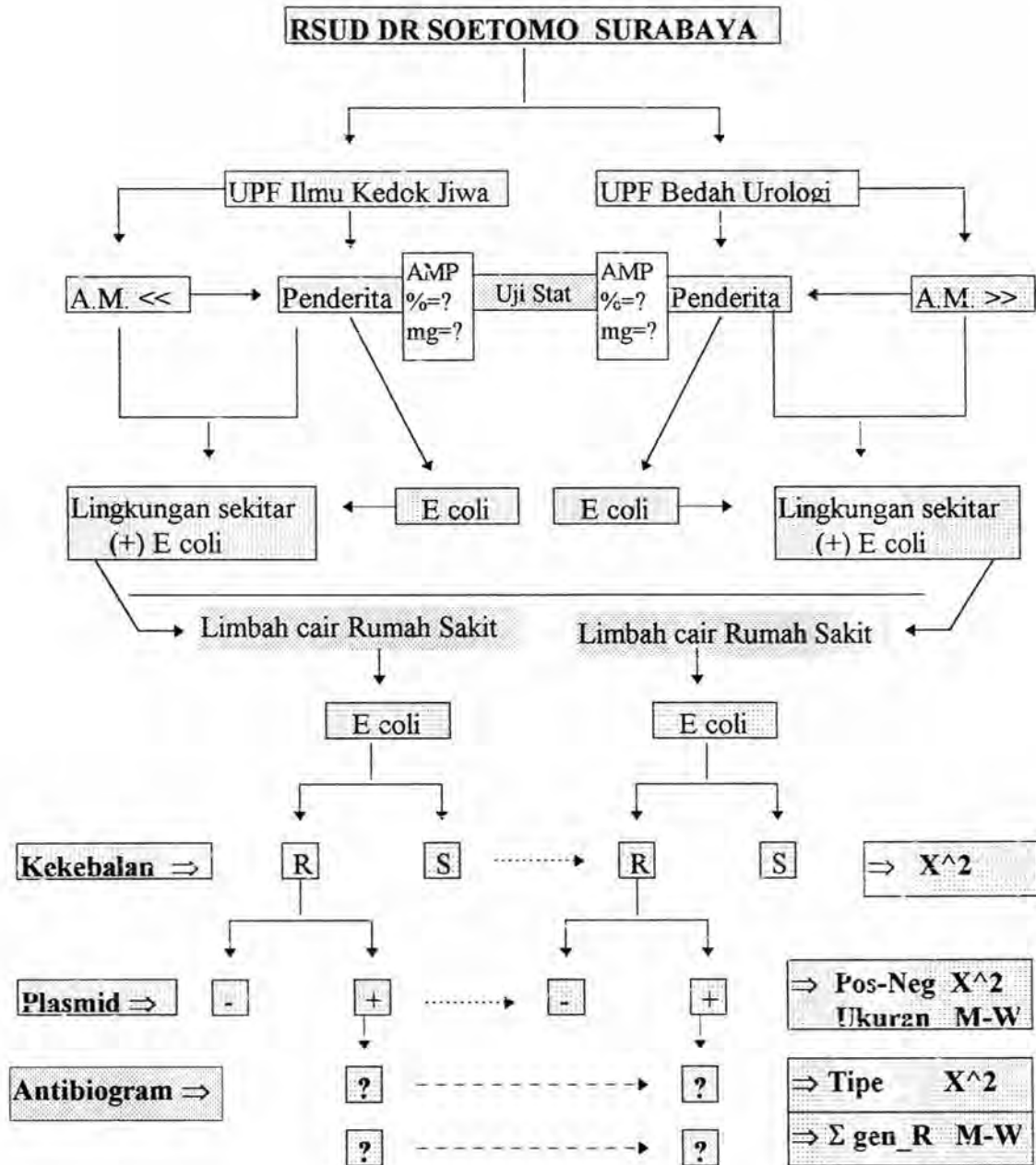
4.9.2.3 Ukuran plasmid

Ukuran plasmid dinyatakan dengan skala ordinal yakni dikelompokkan berdasar kesetaraannya dengan marker yang dipergunakan. Kelompok 1 dengan ukuran plasmid sama atau lebih kecil 4.361 bp, kelompok 2 dengan ukuran antara lebih besar 4.361 bp sampai 9.416 bp dan kelompok 3 lebih besar 9.416 bp sampai 23.130 bp. Ukuran dan spesifikasi marker beserta penjelasannya dapat dilihat pada Bab 5 butir 5.1.3. Perhitungan statistik uji banding ukuran plasmid menggunakan uji Mann-Whitney.

4.9.2.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram pada sei transferman

Plasmid yang berhasil dipisahkan dipastikan mengandung gen pengkode kebal ampisilin. Untuk melihat apakah plasmid tersebut juga mengandung gen pengkode kebal antimikroba yang lain yang sering disebut sebagai kebal ganda (*Multi resistance*), maka plasmid dibagi menjadi beberapa tipe. Tipe plasmid yang sama berarti mengandung jumlah dan jenis ekspresi gen yang sama. Penamaan tipe dilakukan dengan pemberian nomor urut angka, yang didasarkan urut abjad nama antimikroba yang diketahui mempunyai gen kebal sebagai gen penyerta terhadap gen pengkode kebal ampisilin. Penamaan dimulai tipe 1, 2, 3 dan seterusnya. Penjelasan lebih rinci pada bab 5 butir 5.5.

Bagan alir metode penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Bagan alir metode penelitian

Keterangan:

R = Kebal ('Resistant'); S = Peka ('Sensitive'); A.M. = Antimikroba; AMP = Ampisilin; + = Ada; - = Tidak ada; << = Sedikit; >> = Banyak; X² = Uji Khi Kuadrat; Pos-Neg = ada atau tidak ada plasmid; Ukuran = Ukuran plasmid; Tipe = Tipe plasmid; M-W = Uji Mann-Whitney; X² = Uji Khi Kuadrat; Uji Stat = Uji Statistik yang sesuai; % = Persentase penderita rawat inap yang mendapat ampisilin; mg = berat rata-rata ampisilin (dalam miligram) per penderita; Antibiogram = Hasil uji kepekaan cara difusi cakram pada sel transforman; Σ gen_R = Jumlah gen kebal antimikroba

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

5.1.1 Tingkat Penggunaan Antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Penelitian tentang penggunaan antimikroba di lokasi penelitian dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama dilakukan selama 31 hari mulai tanggal 20 November 1995 sampai tanggal 20 Desember 1995 sedang tahap kedua dilakukan selama 76 hari mulai tanggal 17 Juni 1996 sampai dengan tanggal 31 Agustus 1996. Jumlah hari penelitian total adalah 107 hari.

Pencatatan semua jenis dan dosis obat dilakukan pada semua penderita yang dirawat di rumah sakit, dan dicatat setiap hari sampai waktu yang ditentukan. Pencatatan dilakukan oleh perawat jaga di ruang perawatan rumah sakit dengan pengawasan oleh peneliti dan perawat kepala ruang, menggunakan daftar isian yang telah disiapkan. Formulir pencatatan dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pada penelitian tersebut telah diperoleh hasil bahwa jumlah penderita yang masuk dalam pencatatan adalah 169 orang penderita di RP IKJ dan 197 orang di RP BU. Berdasar 4 jenis penyakit utama alasan penderita masuk rumah sakit pada RP IKJ adalah, 105 orang menderita skizofrenia, 12 orang menderita psikosa reaktif singkat (PRS), 12 orang dengan psikosa dan 5 orang dengan Sindroma otak organik. Penyakit lain dengan jumlah kasus antara 1 sampai 5 kasus misalnya adiksi, intoksikasi, gangguan kepribadian, nerosa, parafrenia, psikosomatik dan lain-lain. Sedang alasan penderita dirawat di RP BU adalah 67 orang menderita penyakit pembesaran prostat jinak (*Benign*

Prostat Hypertrophy = BPH), 26 orang menderita penyakit batu ginjal dan ureter, 24 orang menderita penyakit striktura uretra dan 11 orang menderita batu buli-buli. Penyakit lain dengan jumlah kasus antara 1 sampai 8 kasus misalnya basalioma, fistula ani, hernia, kanker buli-buli, hidrokel dan lain-lain. Secara lebih jelas dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1

Jenis dan jumlah penyakit pada penderita rawat inap RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

RSUD DR Soetomo Surabaya						
RP IKJ				RP BU		
NO	Jenis Penyakit	Jml	Persen	Jenis Penyakit	Jml	Persen
1	Skizofrenia	105	62,13	<i>BPH</i>	67	34,72
2	PRS	12	7,10	Batu Ginjal/Ureter	26	13,47
3	Psikosa	12	7,10	Striktura uretra	24	12,44
4	SOO	5	3	BBB	11	5,6
5	Lain-lain	35	20,71	Lain-lain	69	35,03

Keterangan: Jml = Jumlah

PRS = Psikosa Reaktif Singkat; SOO = Sindroma Otak Organik
BPH = Benign Prostat Hypertrophy; BBB = Batu Buli Buli

Berdasar gambaran sebaran jenis penyakit pada kedua lokasi penelitian menunjukkan bahwa penderita di RP BU dirawat dengan penyakit yang mempunyai resiko tinggi untuk terjadinya infeksi. Sedangkan penderita di RP IKJ dirawat dengan penyakit-penyakit yang bukan infeksi atau resiko lebih kecil untuk terjadinya infeksi. Khusus di RP BU, pemberian antimikroba selain ditujukan untuk pengobatan penyakit infeksi, juga diberikan sebagai pencegahan pada penderita menjelang dilakukan tindakan operasi dengan kemungkinan terjadi infeksi.

Pada penelaahan obat antimikroba dari berbagai jenis (golongan cincin beta laktam maupun bukan golongan cincin beta laktam), diperoleh hasil bahwa pada RP IKJ ada 18 orang (10,7%) mendapat antimikroba dari berbagai jenis. Jika diamati tiap-tiap

antimikroba, 9 orang (5,3% dari jumlah total penderita) mendapat ampisilin, tidak ada penderita yang mendapat sulbenisilin maupun sefalosporin, sedang golongan cincin beta laktam gabungan dari berbagai jenis (ampisilin dan nir-ampisilin) diatas diberikan kepada 14 orang (8,28% dari jumlah total penderita yang dirawat). Pada RP BU, 163 orang (84,46%) mendapat antimikroba dari berbagai jenis. Jika pengamatan dilakukan pada setiap antimikroba, 46 orang (23,83% dari jumlah total penderita) mendapat ampisilin, 63 orang (32,64%) mendapat sulbenisilin (penisilin semisintetik), 48 orang (24,87%) mendapat sefalosporin, sedang golongan cincin beta laktam gabungan dari berbagai jenis (ampisilin dan nir-ampisilin) diberikan kepada 142 orang (73,58% dari jumlah total penderita). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Pada pengamatan yang dilakukan berdasar dosis antimikroba yang diberikan pada penderita, untuk RP IKJ, ampisilin total yang diberikan pada penderita selama penelitian adalah 63 gram. Dosis rata-rata per penderita (jumlah penderita total = 169 orang) adalah 0,3728 gram dengan simpangan baku 1,668 gram. Sedangkan di RP BU, ampisilin total yang diberikan kepada penderita selama penelitian adalah 189 gram. Dosis rata-rata per penderita adalah 0,9793 gram dengan simpangan baku 2,452 gram.

Pada pengamatan antimikroba golongan cincin beta laktam nir-ampisilin, yakni sulbenisilin dan sefalosporin, menunjukkan hasil yang mirip. Dosis total sulbenisilin yang diberikan kepada penderita di RP IKJ adalah nol, sedangkan dosis total yang diberikan pada penderita di RP BU sebesar 461,8 gram dengan rata-rata per penderita 2,3927 gram. Untuk antimikroba sefalosporin, dosis total yang diberikan penderita di RP IKJ juga nol sedangkan di RP BU adalah 186,9 gram dengan dosis rata-rata 0,9684 gram per penderita. Jika semua antimikroba golongan cincin beta laktam (ampisilin dan nir-ampisilin)

digabung, diperoleh hasil bahwa dosis total untuk penderita di RP IKJ adalah 87,95 gram dengan rata-rata 0,5204 gram, sedangkan untuk RP BU, dosis total adalah 857,7 gram dengan rata-rata per penderita adalah 4,4440 gram.

Tabel 5.2

Distribusi penggunaan antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Antimikroba	RSUD DR Soetomo Surabaya				Khi-2 (p)
	RP IKJ		RP BU		
	Jumlah	Persen	Jumlah	Persen	
1. Mendapat AM*	18	10,65	163	84,46	0,001
2. Mendapat AM Ampisilin	9	5,33	46	23,83	0,001
3. Mendapat AM Sulbenisilin	0	0	63	32,64	0,001
4. Mendapat AM Sefalosporin	0	0	48	24,87	0,001
5. Mendapat semua AM golongan beta laktam	14	8,28	142	73,58	0,001
Penderita total	169	100	193**	100	

Keterangan: KHI 2 = Uji Khi Kuadrat; (p) = nilai p

AM = Antinukroba

AM* = Antimikroba satu jenis atau lebih

** = Penderita total 197, data tidak lengkap ('Missing') 4 orang

Persen = Jumlah penderita mendapat A.M. jumlah total penderita

Tabel 5.3

Dosis ampisilin dan antimikroba golongan cincin beta laktam yang lain yang diberikan pada penderita di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Antimikroba	RSUD DR Soetomo Surabaya				Uji M-W (p)
	RP IKJ (169 Penderita)		RP BU (193 Penderita)		
	Dosis Total	Dosis Per Penderita	Dosis Total	Dosis Per Penderita	
1. Ampisilin	63	0,3728	189	0,9793	0,001
2. Sulbenisilin	0	0	461,8	2,3927	0,001
3. Sefalosporin	0	0	186,9	0,9684	0,001
4. Semua a.m. golongan beta laktam	87,95	0,5204	857,7	4,4440	0,001

Keterangan: Uji M-W = Uji statistik Mann-Whitney; p = nilai p

5.1.2 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin yang dikode plasmid

5.1.2.1 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin

Pengambilan sampel limbah cair rumah sakit dilakukan mulai bulan Mei 1996 sampai bulan Desember 1996 dengan frekuensi 2 sampai 3 kali pengambilan per minggu. Sampel diambil dari berbagai tempat pada aliran limbah cair keluar ruang perawatan penderita, baik di RP IKJ maupun RP BU. Pengambilan sampel dilakukan secara bergantian antara kedua lokasi penelitian.

Tiap satu sampel limbah cair, dipisahkan sebanyak 3 galur *Escherichia coli*. Dalam kurun waktu 6 bulan, telah dipisahkan sebanyak 210 galur *Escherichia coli* dari masing-masing lokasi penelitian. Pada uji kepekaan cara pengenceran agar, diperoleh hasil bahwa pada 210 galur *Escherichia coli* dari RP IKJ, 39 galur (18,06%) peka terhadap ampisilin dan 171 galur (80,95%) kebal, sedang isolat dari RP BU, 36 galur (17,12%) peka dan 174 galur (81,4%) kebal terhadap ampisilin.

Tabel 5.4

Hasil pemeriksaan kepekaan pada 210 isolat *Escherichia coli* terhadap ampisilin pada isolat dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Kepekaan	RSUD DR Soetomo Surabaya				Uji Khi-2 (p)
	RP IKJ		RP BU		
	Jumlah isolat	Persen	Jumlah isolat	Persen	
Peka	39	18,60	36	17,10	0,7989
Kebal	171	81,40	174	82,90	
Total	210	100	210	100	

Keterangan: Uji Khi-2 = Uji Khi Kuadrat

5.1.2.2 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin yang dikode plasmid

Telah diperoleh hasil bahwa pada 210 isolat *Escherichia coli* dari RP IKJ, terdapat 171 galur *Escherichia coli* kebal ampisilin, sedangkan pada 210 isolat dari RP BU, terdapat 174 galur kebal ampisilin. Selanjutnya semua galur kebal ampisilin diperiksa adanya plasmid pengkode kebal ampisilin melalui uji transformasi.

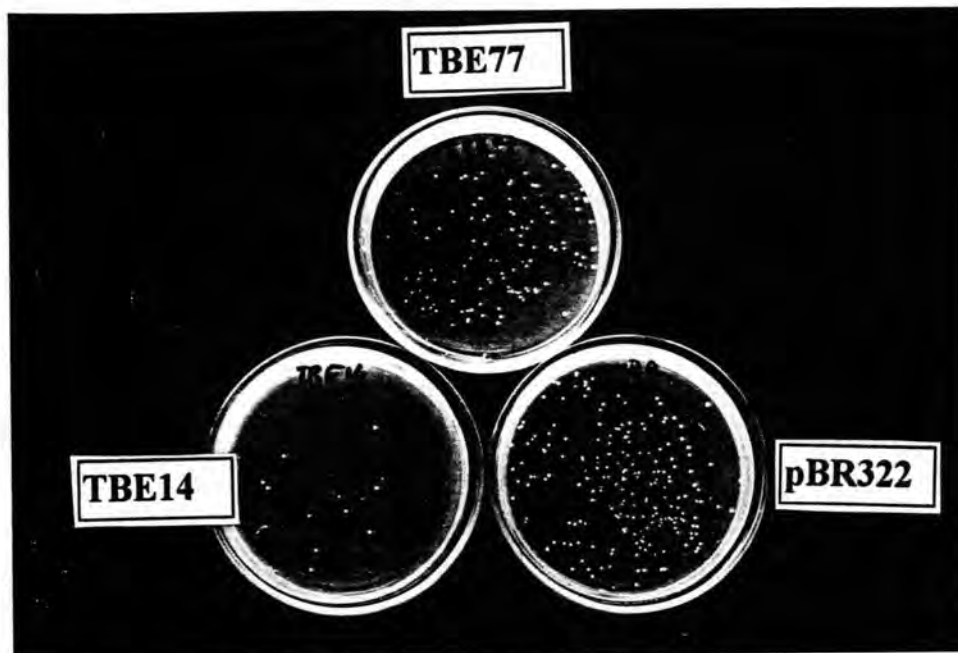
Pada 171 galur *Escherichia coli* kebal ampisilin dari RP IKJ, menunjukkan ada 28 galur (16,37%) mempunyai plasmid pengkode kebal ampisilin, sedangkan pada 174 galur *Escherichia coli* dari RP BU, 58 galur (33,33%) menunjukkan uji transformasi positif yang berarti mengandung plasmid pengkode kebal ampisilin. Lihat Tabel 5.5. Uji transformasi positif ditandai dengan adanya pertumbuhan *Escherichia coli* acuan galur *DH5alfa* yang telah ditransformasi, pada media Luria Bertani (LB) yang diisi ampisilin kadar 64 mikrogram per mililiter. Lihat Gambar 5.1.

Tabel 5.5

Hasil uji transformasi untuk mencari adanya plasmid pengkode kebal ampisilin pada 171 isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin yang dipisahkan dari RP IKJ dan 174 isolat dari RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Transformasi	RSUD DR Soetomo Surabaya				Uji Khi-2 (p)
	RP IKJ		RP BU		
	Jumlah	Persen	Jumlah	Persen	
Positif	28	16,37	58	33,33	0,001
Negatif	143	83,63	116	66,67	
Total Isolat Kebal Ampisilin	171	100	174	100	

Keterangan: Uji Khi-2 = Uji Khi Kuadrat
Transformasi = Hasil uji transformasi



Gambar 5.1 Foto hasil uji transformasi positif dengan kontrol *pBR322*

Keterangan:

TBE14 : Hasil transformasi sampel BE14

TBE77 : Hasil transformasi sampel BE77

pBR322 : Hasil transformasi *pBR322* sebagai kontrol

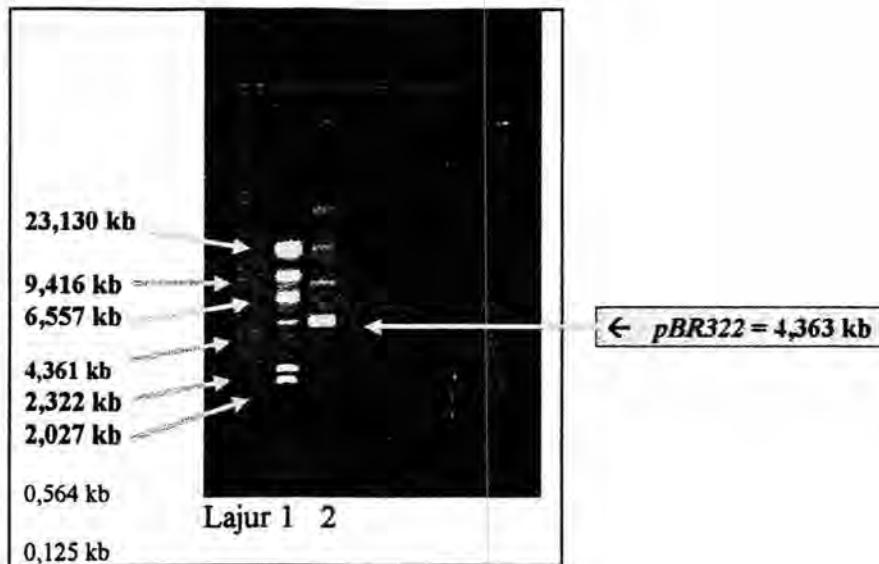
5.1.3 Ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin

Untuk membuktikan bahwa kebal ampisilin tersebut diperankan oleh plasmid, perlu dilakukan visualisasi adanya plasmid yang mengikuti munculnya bakteri acuan yang semula peka menjadi kebal. Visualisasi plasmid yang merupakan untaian DNA dengan panjang tertentu dalam satuan pasangan basa (base pair=bp atau kilo base pair = kb), dapat dilihat dengan melakukan elektroforese dengan menggunakan agarose 0,8% dalam larutan dapar TBE 0,5 X, dan selanjutnya dilakukan pengecatan dengan larutan etidium bromid 0,5 ng per ml. Selanjutnya difoto dengan kamera polaroid hitam putih menggunakan filter oranye. Hasilnya adalah pita putih dalam latar belakang hitam. Dengan menyertakan petanda (Marker) ukuran DNA, maka ukuran panjang plasmid dapat diperkirakan. Sebagai petanda adalah *lambda HindIII* sehingga menghasilkan potongan DNA dengan ukuran panjang berturut-turut 23,130 kb, 9,416 kb, 6,557 kb, 4,361 kb, 2,322 kb, 2,027 kb, 0,564 kb, 0,125 kb (Sambrook *et al.*, 1989). Dipergunakan petanda buatan Promega. Lihat Tabel 5.6.

Tabel 5.6
Potongan petanda (Marker) *Lambda HindIII*

NO.	Ukuran (kb)
1	23,130 kb
2	9,416 kb
3	6,557 kb
4	4,361 kb
5	2,322 kb
6	2,027 kb
7	0,564 kb
8	0,125 kb

Hasil foto petanda (marker) dengan kontrol *pBR322* dengan ukuran 4,363 kb dapat dilihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2.

Hasil foto polaroid petanda *lambda HindIII* dan *pBR322* yang mempunyai ukuran 4,363 kb.

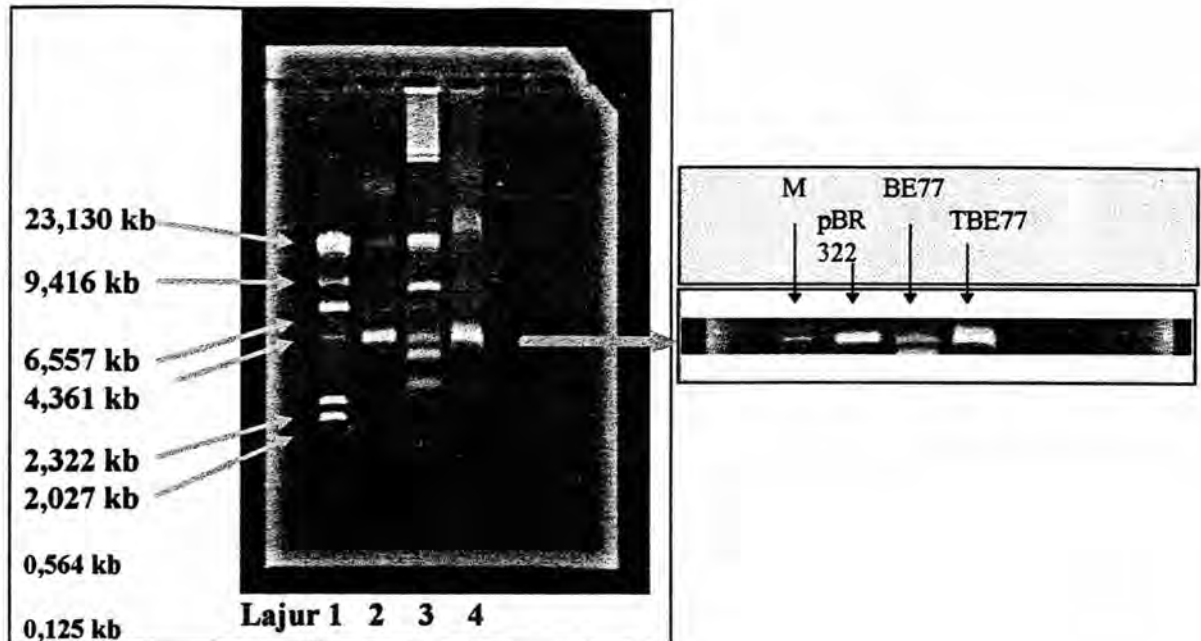
Keterangan: Lajur 1 = Hasil elektroforese *Lambda HindIII*

Lajur 2 = Hasil elektroforese *pBR322* (ukuran = 4,363 kb)
isolat dari sel transforman *pBR322-DH5alfa*

Sebagai persiapan visualisasi plasmid, pada semua sel *Escherichia coli* transforman, yakni sel acuan yang semula peka ampisilin menjadi kebal ampisilin setelah uji transformasi, dilakukan pemisahan plasmid metode lisis alkali (Sambrook *et al.*, 1989). Selain itu dilakukan juga pemisahan plasmid pada *Escherichia coli* acuan sebelum dilakukan uji transformasi sehingga diketahui adanya plasmid yang secara alami telah dimiliki oleh *Escherichia coli* acuan (*Escherichia coli* galur *DH5alfa*).

Hasil pemisahan plasmid pada *Escherichia coli* acuan yang telah diisi *pBR322* ternyata disamping adanya *pBR322* dengan ukuran 4,363 kb, ditemukan juga isolat (plasmid) dengan perkiraan ukuran sekitar 23 kb dan 60 kb. Lihat Gambar 5.2. Jadi

adanya plasmid baru diluar ukuran tersebut dianggap sebagai plasmid baru pengkode kebal ampisilin yang berasal dari *Escherichia coli* sampel.



Gambar 5.3.

Hasil foto elektrofores agar terhadap isolat plasmid pengkode kebal ampisilin dari sampel TBE77 (sel transforman *Escherichia coli* DH5alfa dengan isolat plasmid dari sampel *Escherichia coli* BE77 dari RP BU).

Keterangan: Lajur 1: Petanda (Marker) faga lamda dipotong dengan enzim *HindIII*

Lajur 2: Isolat *pBR322* dari sel transforman *E. coli* DH5alfa dengan *pBR322* (Produksi Promega)

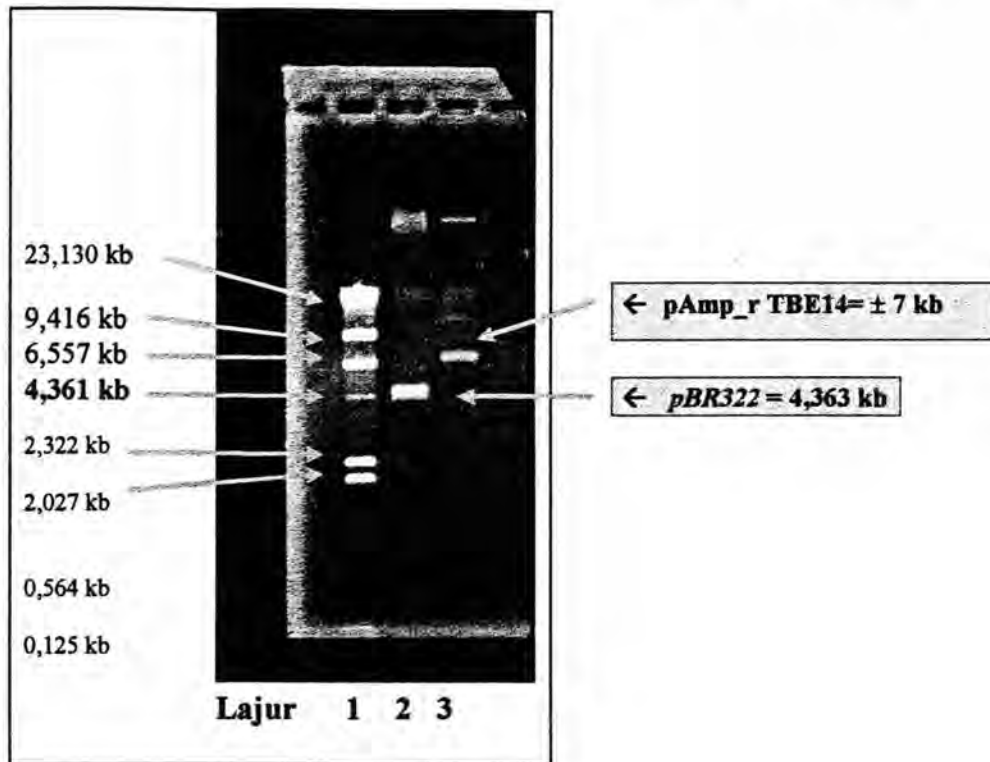
Lajur 3: Isolat plasmid dari sampel *Escherichia coli* nomor 77 dari RP BU (BE77)

Lajur 4: Isolat plasmid pada sel transforman sampel nomor BE77 dari RP BU (TBE77; T berarti transforman)

Hasil visualisasi plasmid pengkode kebal ampisilin, dapat dilihat pada Gambar 5.3.

Pada gambar ini terlihat bahwa pada sampel nomor 77 isolat *Escherichia coli* dari RP BU, mempunyai ukuran panjang sekitar 4 kb. Pada isolat lain, yakni pada sampel *Escherichia*

coli nomor 14 dari RP BU, ditemukan plasmid dengan ukuran perkiraan 7 kb. (Gambar 5.4). Plasmid dengan ukuran lebih besar ditemukan pada beberapa sampel, seperti sampel dari RP BU nomor 6, 22 dan 55 dengan ukuran sekitar 15 kb. (Gambar 5.5.)



Gambar 5.4

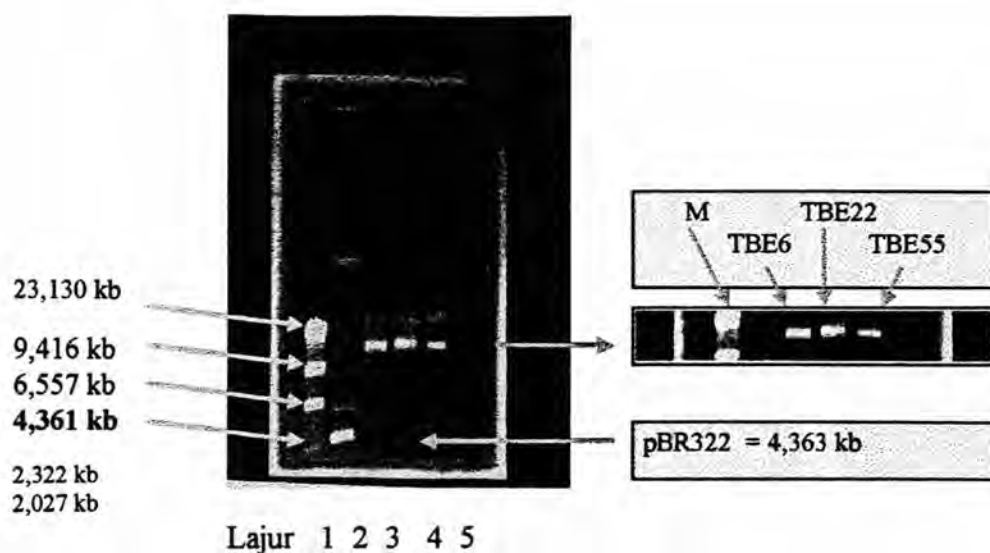
Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforesi agar menggunakan pengecatan etidium bromid, dari sel transforman *Escherichia coli* DH5 α dengan sampel nomor 14 dari RP BU dan ditemukan plasmid ukuran 7 kb.

Keterangan: Lajur 1: Petanda (Marker) Faga lamda dipotong dengan enzim *HindIII*

Lajur 2: Transforman *pBR322* pada *Escherichia coli* DH5 α

Lajur 3: Isolat plasmid kebal ampisilin dari sel transforman TBE14 (*pAmp_r* TBE14 dengan perkiraan ukuran = ± 7 kb)

Sedangkan pada Gambar 5.6, dapat dilihat beberapa plasmid dari isolat RP IKJ dengan ukuran sekitar 3,5 kb.



Gambar 5.5

Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforesis agar dengan pengecatan etidium bromid dari sel transforman *Escherichia coli DH5alpha* dengan sampel nomor 6, 22 dan 55 dari RP BU dan ditemukan plasmid ukuran sekitar 15 kb.

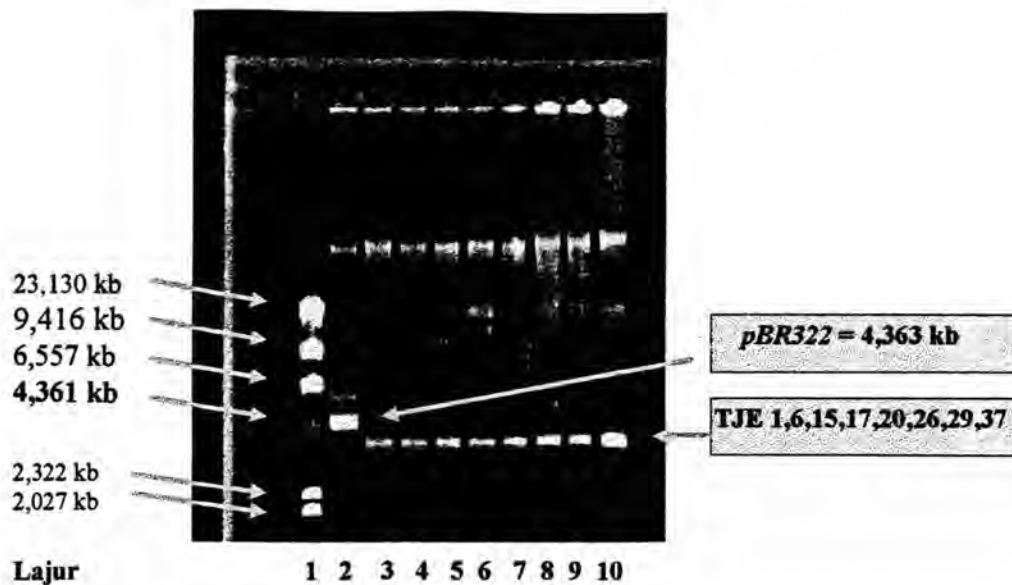
Keterangan: Lajur 1: Petanda (Marker) Faga lamda dipotong dengan enzim *HindIII*

Lajur 2: Transforman *pBR322* pada *Escherichia coli DH5alpha*

Lajur 3: Plasmid kebal ampisilin dari sel transforman TBE6

Lajur 4: Plasmid kebal ampisilin dari sel transforman TBE22

Lajur 5: Plasmid kebal ampisilin dari sel transforman TBE55



Gambar 5.6

Foto polaroid isolat plasmid pada elektroforesi agar dengan pengecatan etidium bromid 50 ng%, dari sel transforman *Escherichia coli DH5alfa* dengan sampel nomor 1, 6, 15, 17, 20, 26, 29 dan 37 dari RP IKJ dan ditemukan plasmid ukuran sekitar 3,5 kb.

Keterangan: Lajur 1: Petanda (Marker) *lamda HindIII*

Lajur 2: Transforman *pBR322* pada *Escherichia coli DH5alfa*

Lajur 3 sampai dengan 10 adalah isolat plasmid dari RP IKJ (TJE)

TJE 1, 6, 15, 17, 20, 26, 29 dan 37

Pada pemeriksaan *Escherichia coli* transforman, diperoleh hasil bahwa terdapat plasmid baru dengan berat berbagai ukuran. Untuk itu peneliti membagi ukuran plasmid dalam tiga kelompok yakni **kelompok 1** dengan ukuran panjang 4,361 kb atau lebih kecil, **kelompok 2** dengan ukuran lebih besar 4,361 kb sampai dengan 9,416 kb dan **kelompok 3** dengan ukuran lebih besar 9,416 kb sampai dengan 23,130 kb. Penggolongan ini

didasarkan pada empat pertimbangan yakni: 1). ukuran plasmid kekebalan telah dikenal sebagai plasmid kecil dengan berat pada kisaran 15 kb; 2). gen pengkode kebal ampisilin pada berbagai isolat, mempunyai ukuran sekitar 1 kb sampai 1,5 kb yang menjadi panjang karena bergabungnya berbagai gen lain; 3). pada penelaahan beberapa isolat plasmid pada penelitian ini, ditemukan plasmid dengan ukuran sekitar 3 kb sampai sekitar 15 kb. 4). petanda (= Marker) yang tersedia di pasaran yang sesuai untuk menjanging ukuran plasmid kekebalan yang merupakan plasmid kecil adalah *lambda HindIII* (Lihat Tabel 5.6). Berdasar pengelompokan ukuran plasmid tersebut diketahui bahwa ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin dari isolat RP IKJ adalah 28 galur untuk panjang kelompok 1, dan tidak ada plasmid dengan ukuran kelompok 2 dan 3. Sedangkan hasil isolat dari RP BU diperoleh hasil ukuran panjang plasmid dalam kelompok 1 sebanyak 38 (65,52 %) galur, kelompok 2 ada 10 (17,24 %) galur dan kelompok 3 ada 10 (17,24 %) galur. Lihat Tabel 5.7.

Tabel 5.7

Distribusi plasmid berdasar kelompok ukuran panjang, pada *Escherichia coli* isolat dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Kelompok Ukuran Plasmid	RSUD DR Soetomo Surabaya				Total	
	RP IKJ		RP BU			
	Jml	Persen	Jml	Persen	Jml	Persen
1. =< 4,361 kb	28	100	38	65,52	66	76,74
2. > 4,361- 9,416 kb	0	0	10	17,24	10	11,63
3. > 9,416 kb - 23,130 kb	0	0	10	17,24	10	11,63
Total	28	100	58	100	86	100

Keterangan: Jml : Jumlah ; =< : Sama atau lebih kecil; > : Lebih besar

5.1.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram sel transforman

Ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin yang ditemukan pada penelitian ini adalah plasmid dengan ukuran beragam dari kecil sampai yang lebih besar. Munculnya plasmid dengan ukuran yang lebih besar, dapat terjadi karena tiga kemungkinan yaitu: 1). Terdapat berbagai plasmid kekebalan pada bakteri dalam limbah cair rumah sakit akibat penggunaan berbagai antimikroba secara berkelanjutan dalam waktu lama. Pada suatu kesempatan berbagai plasmid tersebut masuk dalam bakteri yang sama, kemudian menggabung (rekombinasi) satu terhadap yang lain; 2). Terjadinya dimerisasi atau penggabungan antar plasmid sejenis, sehingga panjangnya bertambah dengan kelipatan panjang plasmid itu sendiri; 3). Menggabungnya berbagai plasmid pengkode kebal antimikroba dengan plasmid pengkode metabolisme yang lain, khususnya pencemar limbah cair rumah sakit seperti bahan detergen yang secara rutin dipergunakan setiap hari.

Pada kesempatan ini peneliti menganalisis kemungkinan pertama, yakni antimikroba selain ampisilin yang juga dikode oleh gen yang berada bersama dengan plasmid pengkode kebal ampisilin (*ampicillin associated resistance plasmid*) dalam sel transforman. Untuk itu pada semua sel transforman (= *Escherichia coli* galur *DH5alfa* yang telah berisi plasmid sampel) dilakukan uji kepekaan cara difusi cakram. Sifat kekebalan baru yang ada pada sel transforman, namun tidak ada pada sel acuan (*Escherichia coli* galur *DH5alfa*), dianggap sebagai kekebalan baru yang diperankan oleh plasmid sampel.

Pada pemeriksaan kepekaan galur acuan *Escherichia coli DH5alfa*, menunjukkan bahwa bakteri tersebut peka terhadap antimikroba ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, sefaleksin, sefotaksim, sefotiam, sulbenisilin, tetrasiklin dan trimetoprim; bersifat intermediate terhadap antimikroba eritromisin. Hasil pemeriksaan secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8.

Hasil uji kepekaan cara difusi cakram pada *Escherichia coli DH5alfa* terhadap berbagai antimikroba.

Jenis Antimikroba	Lebar daerah hambatan sebagai pedoman pembacaan kekebalan	
	Diameter daerah hambatan (mm)	Kesimpulan
1. Ampisilin (AMP10)	28	Peka
2. Eritromisin (E15)	14	Intermediate
3. Kloramfenikol (C30)	32	Peka
4. Kanamisin (K30)	24	Peka
5. Sefaleksin (CL30)	26	Peka
6. Sefotaksim (CTX30)	46	Peka
7. Sefotiam (CTM30)	32	Peka
8. Sulbenisilin (SUL100)	34	Peka
9. Tetrasiklin (TE30)	34	Peka
10. Trimetoprim (W5)	38	Peka

Keterangan: mm = milimeter

Sel transforman yang dihasilkan dari uji transformasi adalah sebanyak 28 galur dari RP IKJ dan 58 galur dari RP BU. Pada uji kepekaan cara difusi cakram, ditemukan hasil yang beragam. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5. Untuk itu peneliti membagi ke dalam beberapa tipe kekebalan berdasar jenis antimikroba yang telah menjadi kebal. Untuk menggolongkan tipe tersebut, antimikroba diurut berdasarkan abjad huruf pertama nama antimikroba dan diikuti huruf berikutnya.

Berdasar atas kekebalan terhadap beberapa antimikroba, ditemukan 3 tipe sel transforman (yang mencerminkan 3 tipe plasmid) yaitu:

- a. **Tipe 1:** Kebal terhadap Ampisilin, Eritromisin, Kanamisin, Sulbenisilin, Trimetoprim.
- b. **Tipe 2:** Kebal terhadap Ampisilin, Kloramfenikol, Sulbenisilin, Trimetoprim
- c. **Tipe 3:** Kebal terhadap Ampisilin, Sulbenisilin

Berdasar penggolongan tersebut, pada analisis uji kepekaan *Escherichia coli* transforman dari isolat plasmid pada RP IKJ diketahui bahwa tidak ada galur yang mempunyai kekebalan tipe 1; 3 (10,7%) galur mempunyai kekebalan tipe 2; 25 (89,29%) galur mempunyai kekebalan tipe 3. Sedang hasil di RP BU, 4 (6,9%) galur mempunyai kekebalan tipe 1; 6 (10,34%) galur mempunyai kekebalan tipe 2 dan 48 galur mempunyai kekebalan tipe 3. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.9. Gambaran secara jelas kaitan kemunculan plasmid yang disertai dengan munculnya kekebalan baru dapat dilihat pada Gambar 5.7.

Tabel 5.9

Hasil uji kepekaan sel transforman terhadap beberapa jenis antimikroba yang menunjukkan tipe plasmid pada sel transforman.

Hasil uji kepekaan = tipe plasmid	RSUD Dr. Soetomo Surabaya				X-2 (p)
	RP IKJ		RP BU		
	Jumlah	Persen	Jumlah	Persen	
Tipe 1	0	0	4	6,90	
Tipe 2	3	10,71	6	10,34	
Tipe 3	25	89,29	48	82,76	
Jumlah total	28	100	58	100	0,363

Keterangan: X-2 = Uji Khi kuadrat;

p = nilai p pada uji statistik

Tipe plasmid dinyatakan sebagai pola kekebalan sel transforman terhadap antimikroba acuan

Tabel 5.10.

Perubahan kekebalan sel transforman TBE77 yang berasal dari *Escherichia coli* DH5alfa setelah mendapatkan plasmid dari sampel *Escherichia coli* BE77 yang berasal dari RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Jenis Antimikroba	Bakteri yang diuji	
	<i>E.coli</i> DH5alfa	TBE77
1. Ampisilin (AMP10)	S	R
2. Eritromisin (E15)	I	i
3. Kloramfenikol (C30)	S	S
4. Kanamisin (K30)	S	S
5. Sefaleksin (CL30)	S	S
6. Sefotaksim (CTX30)	S	S
7. Sefotiam (CTM30)	S	S
8. Sulbenisilin (SUL100)	S	R
9. Tetrasiklin (TE30)	S	S
10. Trimetoprim (W5)	S	S

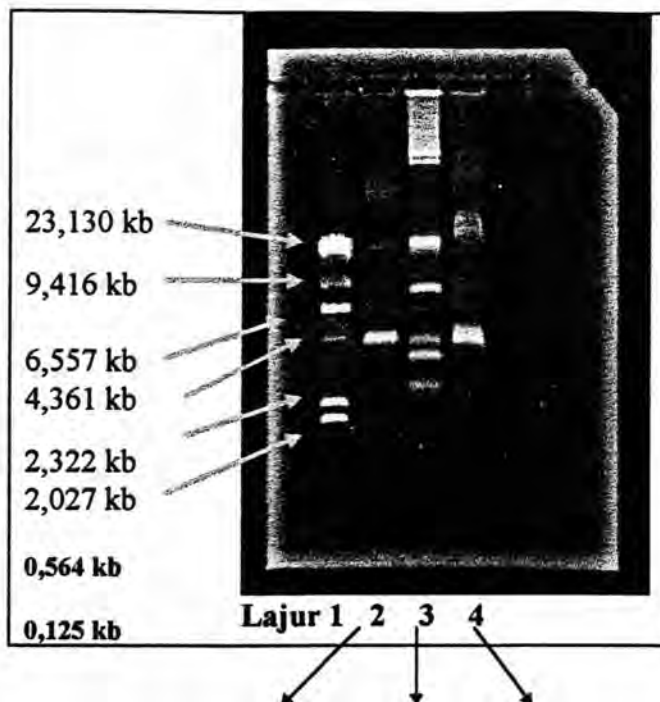
Keterangan: TBE77 = sel transforman setelah ditransformasi oleh isolat plasmid berasal dari *Escherichia coli* BE77.

BE77 = *Escherichia coli* isolat nomor 77 dari RP BU

S = Peka ('Sensitive'); I = Intermediate; R = Kebal ('Resistant')

Sebagai gambaran perubahan kekebalan berkaitan dengan plasmid baru, dapat dilihat pada Tabel 5.10, sedangkan hasil uji kepekaan cara difusi cakram dapat dilihat pada Gambar 5.7. Pada hasil ini terlihat bahwa *pBR322* yang diketahui mengandaung gen kebal ampisilin dan tetrasiklin, menunjukkan hasil sel transforman yang kebal terhadap ampisilin, tetrasiklin dan sulbenisilin. Kekebalan sulbenisilin ini menunjukkan bahwa plasmid menghasilkan enzim beta laktamase yang selain merusak ampisilin, juga merusak sulbenisilin.

Kebal sulbenisilin ternyata sama 100% dengan kebal ampisilin, dan menurut peneliti, memang kedua kekebalan ini diperankan oleh satu gen yang sama dan salah satu gen yang berperan sama yakni gen pengkode enzim beta laktamase. Jadi gen penyerta pada plasmid pengkode kebal ampisilin adalah tiga gen (eritromisin, kanamisin, trimetoprim) untuk plasmid tipe 1; dua gen (kloramfenikol, trimetoprim) untuk plasmid tipe 2; dan tipe 3 tidak mengandung gen penyerta. Sedangkan jumlah gen total pada tiap tipe plasmid adalah tipe 1 ada 4 gen kebal antimikroba, tipe 2 ada 3 gen dan tipe 3 ada 1 gen. Selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.11.



Antimikroba	Lajur	DH5alfa	1 M	2 pBR322	3 BE77	4 TBE77
1. Ampisilin		S		R	R	R
2. Eritromisin		I		I	I	I
3. Kloramfenikol		S		S	S	S
4. Kanamisin		S		S	S	S
5. Sefaleksin		S		S	S	S
6. Sefotaksim		S		S	S	S
7. Sefotiam		S		S	S	S
8. Sulbenisilin		S		R	R	R
9. Tetrasiklin		S		R	S	S
10. Trimetoprim		S		S	R	S

Gambar 5.7.

Hasil foto polaroid isolat plasmid dari transforman pBR322-*Escherichia coli* DH5alfa, sel transforman (TBE77) dan *Escherichia coli* sampel (BE77), serta hasil uji kepekaan terhadap 10 jenis antimikroba

Keterangan: Lajur 1 : M = Marker = Petanda Ukuran plasmid

Lajur 2 : Transforman pBR322 pada *Escherichia coli* DH5alfa

Lajur 3 : BE77 = *Escherichia coli* sampel nomor 77 dari RP BU

Lajur 4 : TBE77 = Sel transforman DH5alfa dengan plasmid dari BE77

Tabel 5.11 Jumlah gen yang berada bersama pada tiap tipe plasmid pada 86 plasmid pengkode kebal ampisilin di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Tipe Pla	RSUD DR SOETOMO SURABAYA					
	RP IKJ			RP BU		
	Jml Pla	Gen_R	Gen_P	Jml Pla	Gen_R	Gen_P
1	0	-	-	4	4x4=16	3x4=12
2	3	3x3=9	2x3=6	6	3x6=18	2x6=12
3	25	1x25=25	0	48	1x48=48	0
Total	28	34	6	58	82	24

Keterangan:

Tipe Pla = Tipe plasmid

Jml Pla = Jumlah plasmid

Gen_R = Jumlah gen pengkode kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin); Plasmid tipe 1 = 4 gen; tipe 2 = 3 gen; tipe 3 = 1 gen

Gen_P = Jumlah gen kebal penyerta (nir-ampisilin)
Plasmid tipe 1 = 3 gen; tipe 2 = 2 gen; tipe 3 = nol

Uji Statistik Uji Mann-Whitney Gen_R: RP BU \times RP IKJ: $p = 0,3822$

5.2. Analisis dan Hasil Penelitian

5.2.1 Tingkat Penggunaan Antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan

RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Data tentang jumlah penderita yang mendapat antimikroba selama perawatan, yang kemudian dinyatakan dalam prosen, adalah data nominal. Jadi perhitungan statistik dilakukan dengan uji non-parametrik khi kuadrat.

Jika ditelaah jumlah penderita yang mendapat antimikroba dengan berbagai jenis, atau yang mendapat ampisilin, maupun yang mendapat antimikroba golongan cincin beta laktam, terdapat perbedaan yang bermakna antara RP IKJ terhadap RP BU dalam batas kemaknaan 5%. Pada perhitungan statistik diperoleh nilai p untuk penderita yang mendapat antimikroba dengan berbagai jenis adalah 0,001 (lebih kecil dari 0,05), untuk penderita yang mendapat ampisilin, sulbenisilin maupun sefalosporin, maupun gabungan antimikroba golongan beta laktam, nilai p adalah 0,001 (lebih kecil dari 0,05). (Tabel 5.2. dan Lampiran 4).

Data penelitian tentang jumlah (dalam gram) penggunaan antimikroba adalah skala ratio, namun pada uji normalitet dengan uji Kolmogorov-Smirnov, data tidak normal dengan nilai p untuk semua parameter (ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin, dan gabungan semua antimikroba golongan beta laktam) adalah 0,001. Karena itu uji beda Mean dilakukan dengan uji non-parametri Mann-Whitney. Semua analisis dilakukan dengan program komputer SPSS/PC+. (Lampiran 4).

Pada perhitungan statistik antara RP IKJ dan RP BU, untuk penggunaan antimikroba (dalam gram per penderita), menunjukkan perbedaan bermakna pada taraf kemaknaan 5% dengan nilai p untuk semua parameter (ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin,

gabungan antimikroba golongan beta laktam) adalah 0,001 (lebih kecil dari 0,05) (Tabel 5.3. dan Lampiran 4).

Dari berbagai analisis tingkat penggunaan antimikroba di kedua lokasi penelitian, disimpulkan bahwa baik dilihat dari prosentase penderita yang mendapat antimikroba, maupun dosis rata-rata antimikroba per penderita, khususnya ampisilin maupun golongan cincin beta laktam yang lain, baik secara sendiri-sendiri maupun gabungan antimikroba golongan cincin beta laktam, di RP BU adalah lebih tinggi dan berbeda bermakna dibanding RP IKJ.

5.2.2 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin yang dikode plasmid

5.2.2.1 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin

Data hasil pemeriksaan kekebalan adalah skala nominal, yaitu bakteri peka atau kebal terhadap ampisilin. Karena itu uji beda dilakukan dengan uji non-parametrik khi kuadrat.

Hasil uji beda antara RP IKJ dan RP BU, menunjukkan hasil tidak ada beda bermakna dengan nilai $p = 0,7989$ (lebih besar dari 0,05) (Tabel 5.4 dan Lampiran 6).

5.2.2.2 Isolat *Escherichia coli* kebal ampisilin yang dikode plasmid

Data hasil pemeriksaan kekebalan adalah skala nominal, yaitu pada bakteri kebal ampisilin, apakah mempunyai atau tidak mempunyai plasmid pengkode kebal ampisilin. Karena itu uji beda dilakukan dengan uji non-parametrik khi kuadrat.

Pada perhitungan statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin antara RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo

Surabaya, dengan nilai $p = 0,001$ (lebi kecil 0,05). (Tabel 5.5. dan Lampiran 6). Hal ini **berarti hipotesis diterima**.

5.2.3 Ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin

Data ukuran plasmid adalah data ordinal yakni dalam bentuk kelompok. Maka uji beda dilakukan dengan uji non-parametrik Mann-Whitney.

Tabel 5.12

Hasil perhitungan statistik distribusi ukuran plasmid berdasar kelompok dengan uji khi kuadrat, pada isolat dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Kelompok Ukuran Plasmid	RSUD DR Soetomo Surabaya				M-W (p)
	RP IKJ		RP BU		
	Jml	Prosen	Jml	Prosen	
1. ≤ 4.361 bp	28	100	38	65,5	
2. $> 4.361 - 9.416$ bp	0	0	10	17,2	
3. > 9.416 bp - 23.130 bp	0	0	10	17,2	
Total	28	100	58	100	0,001

Keterangan: Jml : Jumlah ; \leq : Sama atau lebih kecil; $>$: Lebih besar
M-W : Uji Mann-Whitney; p : nilai p pada uji statistik

Pada perhitungan statistik dengan menggunakan uji Mann-Whitney diperoleh hasil perbedaan yang bermakna pada batas kemaknaan 5% dengan nilai $p = 0,001$ (lebih kecil 0,05) (Tabel 5.12 dan Lampiran 6). Hal ini **berarti hipotesis diterima**.

5.2.4 Tipe plasmid berdasar antibiogram sel transforman

Data tipe plasmid adalah data nominal, maka uji beda dilakukan dengan uji khi kuadrat. Jika dilakukan analisis angka kejadian beberapa tipe kekebalan yang diperankan oleh plasmid antara RP IKJ dan RP BU dengan menggunakan uji statistik khi kuadrat, didapatkan hasil $p=0,3627$ (lebih besar dari 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa pada batas kemaknaan 5%, tidak ada perbedaan distribusi tipe plasmid diantara kedua lokasi penelitian, **jadi hipotesis ditolak**. Berdasar hal ini pula bisa disimpulkan bahwa tipe plasmid diantara kedua lokasi penelitian adalah sama.

Jumlah total gen kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin) pada tiap tipe plasmid (tiap sel transforman) merupakan data skala ratio. Dengan uji normalitet menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data tidak normal dengan nilai $p = 0,001$. Maka analisis statistik uji beda dilakukan dengan uji Mann-Whitney. Hasilnya adalah pada batas kemaknaan 5%, tidak ada beda jumlah gen kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin) antara RP IKJ dan RP BU dengan $p=0,3822$ (lebih besar dari 0,05). (Tabel 5.11).

Untuk melihat apakah kebersamaan gen kebal antimikroba tersebut berkaitan dengan makin panjangnya ukuran plasmid, perlu dilakukan uji korelasi antara ukuran plasmid dengan jumlah gen kebal antimikroba pada tiap tipe plasmid. Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara makin panjangnya ukuran plasmid dengan makin banyaknya jumlah gen kebal antimikroba, dengan nilai $r = 0,0717$ (Lampiran 6).

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Tingkat Penggunaan Antimikroba di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Tingginya penggunaan antimikroba di rumah sakit kiranya dapat dipahami, mengingat penderita yang dirawat di rumah sakit banyak yang menderita infeksi, disamping mempunyai resiko yang tinggi terhadap terkena infeksi. Resiko untuk mendapat infeksi terutama berkaitan dengan dua hal yakni: 1). adanya tindakan invasif atau adanya luka terbuka atau luka pasca operasi; dan 2). keadaan lingkungan tidak selamanya dalam keadaan aseptis. Keadaan inilah menurut peneliti menyebabkan para dokter memberikan obat antimikroba, baik sebagai terapi maupun sebagai pencegahan.

Tingginya penggunaan antimikroba di RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya dibanding RP IKJ, kiranya berkaitan dengan dua faktor resiko tersebut diatas. Makin tinggi resiko tersebut, akan makin banyak pula penggunaan antimikroba. Kuntaman dkk (1996²) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa penderita yang dirawat di RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya, mengidap 6 penyakit terbanyak adalah : pembesaran prostat jinak, striktur uretra, varikokel, batu ginjal, batu ureter dan batu buli-buli. Hampir semua penderita tersebut mendapat tindakan invasif atau menjalani pembedahan yang akan meningkatkan resiko untuk terjadinya infeksi. Sedangkan di RP IKJ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, 6 penyakit terbanyak pada penderita rawat inap adalah: skizofrenia, parafrenia, psikosa reaktif singkat, sindroma otak organik, adiksi dan nerosa (Kuntaman 2 dkk, 1996¹). Keadaan penyakit di RP IKJ mencerminkan faktor resiko yang rendah untuk

terjadinya infeksi yang membutuhkan penggunaan antimikroba. Adanya penggunaan antimikroba di RP IKJ adalah karena alasan penyakit yang lain yang merupakan penyakit ikutan.

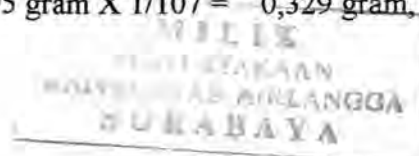
Antimikroba yang paling sering diberikan kepada penderita adalah golongan penisilin yakni ampisilin. Ada dua antimikroba golongan penisilin yang paling banyak beredar di pasaran dan sering dipergunakan yakni ampisilin dan amoksisilin. Utji (1998) pada penelaahan penggunaan antimikroba di Rumah Sakit Persahabatan Jakarta melaporkan bahwa antimikroba yang paling banyak diresepkan adalah golongan penisilin, baik oleh dokter umum maupun dokter spesialis. Hasil ini mirip dengan apa yang dijumpai di RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Soegijanto (1998) pada penelitian di Bagian anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya menunjukkan bahwa penggunaan ampisilin di ruang perawatan Hematologi meliputi 65% penderita, di ruang Syaraf 56% penderita, dan di ruang Penyakit Paru 52% penderita. Sedangkan di ruang Menular Anak, 62% penderita mendapat obat golongan cincin beta laktam yang terdiri 32% penderita mendapat amoksisilin, 5% penderita mendapat penisilin prokain, 17% penderita mendapat ampisilin dan 8% penderita mendapat kloksasilin.

Tingginya penggunaan antimikroba golongan cincin beta laktam ini, terutama karena toksisitasnya yang rendah. Penggunaan yang tinggi ini tidak hanya di Indonesia, namun juga di negara lain. Di RS Bellvitge di Spanyol yang merupakan rumah sakit besar dengan 1000 tempat tidur, antimikroba utama yang dipergunakan, khususnya di ruang perawatan intensip adalah seftriakson, sefotaksim dan seftasidim yang semuanya adalah kelompok sefalosporin dari golongan cincin beta laktam (Pena *et al.*, 1998). Juga di RS Tikur Anbessa di Addis Ababa dan RS Karolina di Stockholm Swedia, antimikroba utama

yang dipergunakan adalah antimikroba golongan cincin beta laktam, meliputi penisilin G, V dan ampisilin (Ringertz *et al.*, 1990).

Jika ditelaah dalam hal dosis ampisilin yang diberikan kepada penderita, ternyata dosis kumulatif selama penelitian dalam kurun waktu yang sama yakni 107 hari, di RP IKJ adalah 63 gram, jauh lebih rendah dibanding di RP BU yang mencapai 189 gram. Jika dihitung rata-rata per penderita adalah 0,3728 gram per penderita di RP IKJ, jauh lebih kecil ($p=0,001$) dibanding RP BU yang mencapai 0,9793 gram. Jika dihitung tingkat penggunaan ampisilin per hari, maka didapatkan hasil bahwa penggunaan ampisilin di RP IKJ adalah 0,589 gram per hari, sedangkan di RP BU adalah 1,747 gram per hari. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat penggunaan ampisilin, baik per penderita maupun per hari di lingkungan RP IKJ lebih rendah dibanding RP BU. Berdasar keadaan ini dapat disimpulkan bahwa tingkat penggunaan antimikroba golongan penisilin, khususnya ampisilin, di RP IKJ lebih kecil dibanding di RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Jika dianggap rata-rata 40% diekskresi dalam bentuk aktif lewat air kemih, hal ini berarti rata-rata tiap hari ampisilin yang terbuang lewat saluran limbah adalah $40\% \times 0,589 \text{ gram} = 0,236 \text{ gram}$ per hari di RP IKJ dan $40\% \times 1,747 \text{ gram} = 0,699 \text{ gram}$ per hari di RP BU. Hal ini berarti penggunaan di RP BU 3 kali lebih besar dibanding RP IKJ. Tingkat penggunaan yang lebih kecil di RP IKJ ini juga terjadi pada antimikroba golongan cincin beta laktam yang lain, terutama sulbenisilin dan sefalosporin, bahkan gabungan pada semua antimikroba golongan cincin beta laktam. Penggunaan total antimikroba golongan cincin beta laktam di RP IKJ adalah 87,95 gram sedang di RP BU adalah 857,7 gram. Jika rata-rata 40% diekskresi lewat air kemih dan dibuang ke saluran air limbah, maka jumlah obat dikeluarkan setiap hari di RP IKJ adalah $40\% \times 87,95 \text{ gram} \times 1/107 = 0,329 \text{ gram}$.



sedangkan di RP BU adalah $40\% \times 857,7 \text{ gram} \times 1/107 = 3,206 \text{ gram}$. Hal ini berarti penggunaan di RP BU adalah 10 kali lebih tinggi dibanding RP IKJ.

6.2 Isolat *Escherichia coli* Kebal Ampisilin

Pada 210 sampel *Escherichia coli* dari masing-masing lokasi penelitian, menunjukkan bahwa angka kejadian bakteri yang kebal ampisilin, adalah sebesar 171 galur (81,4%) di RP IKJ dan 174 galur (82,90%) di RP BU. Perbedaan ini secara statistik tidak berbeda bermakna ($p=0,7989$). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kekebalan *Escherichia coli* isolat limbah rumah sakit sudah sangat tinggi. Jika hasil ini dibandingkan dengan kekebalan *Escherichia coli* penyebab penyakit pada manusia, ternyata sangat tinggi. Utji (1998) dalam penelitiannya pada *Escherichia coli* penyebab penyakit pada manusia, 47% diketahui telah kebal ampisilin. Pada analisis kekebalan *Escherichia coli* terhadap ampisilin pada flora usus staf perawat rumah sakit, didapatkan sebanyak 47,66% telah kebal ampisilin (Kuntaman dkk, 1997).

Tingginya kejadian kebal ampisilin pada *Escherichia coli* isolat limbah cair rumah sakit, dapat terjadi karena beberapa hal, meliputi: 1). Keadaan pencemaran atau penggunaan antimikroba golongan cincin beta laktam, yang terjadi secara terus menerus sejak pertama kali obat tersebut dipergunakan di tempat tersebut, sehingga terjadi efek kumulatif, 2). Paparan secara langsung berbagai bahan kimia yang ada dalam limbah cair rumah sakit, yang dapat mengakibatkan perubahan fenotipik, khususnya dinding sel bakteri, sehingga berakibat peningkatan kekebalan terhadap berbagai antimikroba, khususnya ampisilin. Tingginya angka kejadian kebal antimikroba tersebut terlihat sangat terkait dengan faktor lingkungan khususnya penggunaan antimikroba. Faktor lingkungan

dapat dilihat pada hasil penelitian Kinjo et al (1992) tentang profil kekebalan *Escherichia coli* isolat dari flora tinja domba, dimana angka kejadian plasmid pengkode kebal antimikroba pada domba liar yang sebesar 2,5%, setelah dipelihara di lingkungan penduduk meningkat menjadi 97%. Di Yunani, dimana penggunaan antimikroba sangat bebas, pada penelaahan pola kekebalan bakteri penyebab infeksi pada 55 rumah sakit di tempat tersebut, didapatkan bahwa kekebalan *Enterobacter spp* terhadap antimikroba beta laktam yang meliputi sefalotin telah mencapai 95%, dan terhadap sefotaksim mencapai 77%. Sedangkan kekebalan *Klebsiella pneumoniae* terhadap sefalotin mencapai 63% dan terhadap sefotaksim mencapai 51% (Giamarelou and Antoniadou, 1997). Pada penelaahan flora tinja bayi yang dirawat di rumah sakit, menunjukkan tingginya kebal antimikroba pada flora bayi sangat berkaitan dengan tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan (Tullus et al., 1988). Dengan tingkat penggunaan ampisilin mencapai 43% terhadap semua obat antimikroba yang diberikan, flora *Escherichia coli* yang kebal ampisilin mencapai 88%, sedangkan *Klebsiella spp* yang kebal ampisilin mencapai 89%.

Perubahan dinding sel dengan akibat peningkatan kekebalan, terutama karena menurunnya ekspresi protein porin *OmpF* sebagai pembentuk saluran pada dinding sel bakteri bagian luar (Kunin et al., 1994; Baron et al., 1986), disamping dapat juga karena penurunan ekspresi protein porin *OmpC* (Komatsu et al., 1991). Diketahui bahwa saluran yang dibentuk protein *OmpF* adalah 7-9% lebih besar dibanding saluran yang dibentuk protein porin *OmpC*, sehingga gangguan pada protein *OmpF* lebih nyata dalam mengganggu transportasi obat (Komatsu et al., 1991).

Pada suatu percobaan dengan membiakkan *Escherichia coli* dalam NaCl 5 M, ternyata berakibat sintesis protein dengan berat 31 Kda, dan hal ini ternyata disertai

dengan penurunan ekspresi protein *OmpF* (Baron *et al.*, 1986). Penurunan protein *OmpF* yang disertai dengan peningkatan kekebalan bakteri, juga telah diketahui karena paparan dengan asam salisilat yang disertai peningkatan kekebalan terhadap tetrasiklin (Kunin *et al.*, 1994). Komatsu *et al.* (1991) juga mendapatkan fakta bahwa penurunan ekspresi protein *OmpF* berakibat peningkatan kekebalan 4 - 32 kali, terhadap antimikroba golongan beta laktam, kloramfenikol, tetrasiklin dan kuinolon.

Kemungkinan lain terjadinya peningkatan kekebalan terhadap ampisilin tersebut adalah akibat bocornya dinding sel bakteri akibat suatu mutasi, sehingga enzim beta laktamase yang dihasilkannya bocor keluar (Norstrom *et al.*, 1970). Pada galur mutan *Escherichia coli*, kebocoran enzim ini dapat mencapai 20% bagi enzim beta laktamase yang berisifat kromosomal, dan dapat mencapai 75% untuk enzim beta laktamase yang dikode oleh plasmid. Pada fakta ini ternyata juga disertai peningkatan kekebalan terhadap antimikroba lain, seperti kanamisin, streptomisin dan kloramfenikol.

Dari hasil ini peneliti menyimpulkan bahwa pola kekebalan bakteri terhadap antimikroba tanpa memperhatikan apakah dikode oleh plasmid atau tidak, sangat banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan baik antimikroba maupun non-antimikroba. Keadaan ini menyebabkan perubahan kekebalan tidak hanya ditentukan oleh adanya paparan antimikroba saja, melainkan juga oleh paparan bahan kimiawi lain selain antimikroba, seperti keadaan tekanan osmotik yang tinggi di lingkungan, dan adanya paparan bahan kimia salisilat. Dengan parameter yang lebih spesifik, yakni plasmid yang berisi gen pengkode kekebalan terhadap antimikroba, masalah ini akan dapat dipecahkan.

6.3 Isolat Plasmid Pengkode Kebal Ampisilin

Angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin pada isolat *Escherichia coli* dari RP BU lebih banyak dibanding angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin pada isolat *Escherichia coli* dari RP IKJ. Perbedaan ini bermakna pada batas kemaknaan 5% dengan nilai $p = 0,001$. Hal ini membuktikan bahwa perbedaan tingkat penggunaan ampisilin di kedua tempat tersebut akan terdapat pula perbedaan tingkat kejadian plasmid pengkode kekebalan terhadap ampisilin. Jika peneliti memberikan istilah keberadaan plasmid tersebut sebagai pencemaran plasmid, maka dapat dikatakan bahwa tingginya penggunaan ampisilin akan ditemukan pula tingginya pencemaran plasmid pengkode kebal ampisilin.

Peneliti lain telah pula menunjukkan gambaran serupa, tentang kaitan penggunaan antimikroba golongan beta laktam khususnya ampisilin dan sefalosporin, dengan kejadian plasmid pengkode enzim beta laktamase. Burman et al (1992) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan ampisilin sebagai obat utama di beberapa ruang perawatan neonatus, berkaitan secara bermakna dengan tingginya kejadian *Escherichia coli* penghasil enzim beta laktamase *TEM-1* yang dikode plasmid. Kelompok anak yang mendapat terapi ampisilin ternyata ditemukan *Escherichia coli* penghasil enzim beta laktamase *TEM-1* sebanyak dua kali lebih tinggi dibanding kelompok anak yang tidak mendapat terapi ampisilin. Hasil yang mirip juga terjadi pada bakteri *Klebsiella pneumonia* yang dipisahkan dari tinja anak tersebut. Pada penelitian Burman et al (1992) ini diketahui pula bahwa tingginya penggunaan sefalosporin (jenis yang dipergunakan di sini adalah sefuroksim), ternyata tidak berkaitan dengan tingginya kejadian *Escherichia coli* penghasil enzim beta laktamase yang dikode plasmid. Hal ini mungkin karena

Escherichia coli di tempat tersebut masih bersifat peka terhadap sefuroksim, sehingga bakteri penghasil enzim beta laktamase juga dapat terbunuh. Hal ini dapat dijelaskan melalui penelitian Pena et al (1998) tentang penggunaan obat beta laktam di rumah sakit. Dalam penelitian ini dilaporkan bahwa tingginya penggunaan sefalosporin (jenis yang dipergunakan adalah seftasidim) pada ruang perawatan intensif dalam suatu rumah sakit, sangat berkaitan dengan tingginya kejadian *Klebsiella pneumonia* penghasil enzim beta laktamase jenis *ESBL* (*Extended Spectrum Beta Lactamase*). Setelah dilakukan intervensi dengan cara menurunkan secara bertahap tingkat penggunaan sefalosporin pada terapi penderita (dalam dua tahun penurunan mencapai sampai 1/8 kali), ternyata terjadi penurunan bermakna kejadian *Klebsiella pneumonia* **penghasil ESBL**, sedangkan angka kejadian *Klebsiella pneumonia* **bukan penghasil ESBL** makin banyak.

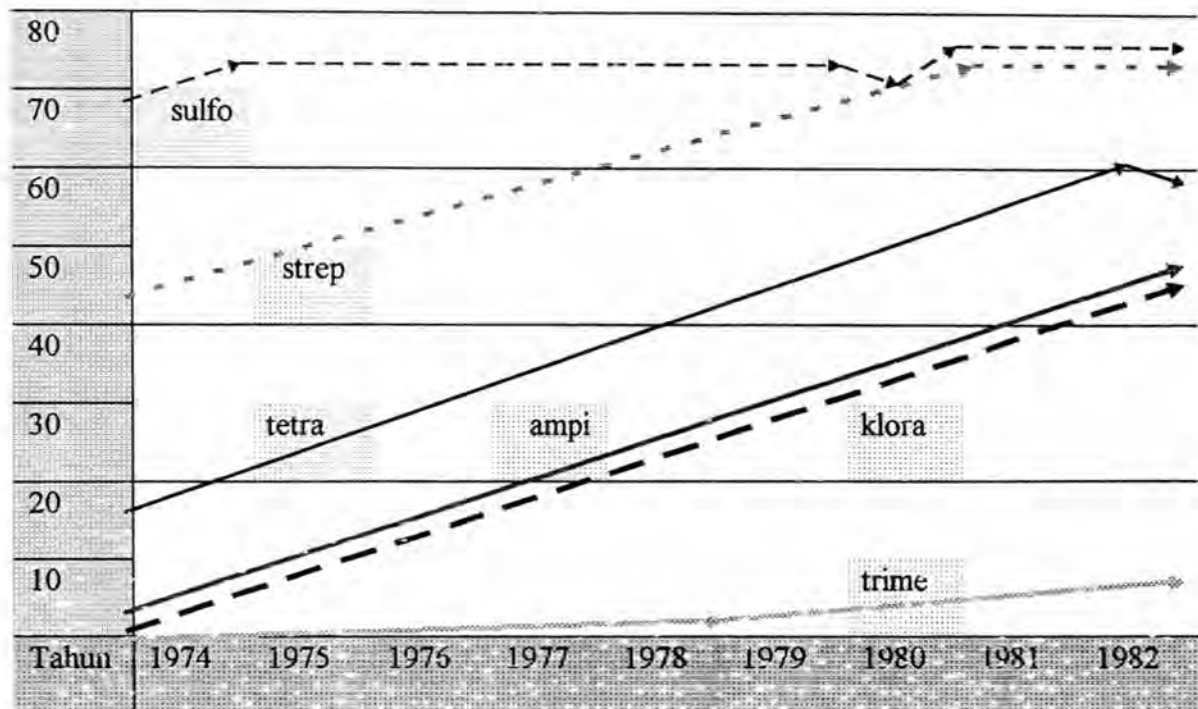
Tingginya angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin di RP BU, dapat terjadi karena peningkatan ekspresi plasmid yang disertai dengan peningkatan kadar plasmid dalam sel bakteri. Hal ini mengakibatkan plasmid mudah berpindah ke bakteri sekitar, disamping tingginya kada plasmid tersebut mengakibatkan menurunnya tingkat pembebasan plasmid pada bakteri turunannya. Nordstrom et al (1984) memberi istilah LF (= '*Loss of Plasmid Free Cell*') yang diartikan sebagai berapa persen turunan bakteri yang terbebas dari plasmid dalam tiap generasi pembelahan. Sebagai contoh pada percobaan plasmid R1 yang berada dalam *Escherichia coli*, jika jumlah plasmid per sel adalah satu, maka nilai LF = 13% yang berarti pada setiap 100 bakteri generasi baru ada 13 bakteri yang plasmidnya terlepas. Jika bakteri dibiakkan pada media cair LB, maka kadar plasmid dalam sel berada pada jumlah 3-4 plasmid per sel bakteri. Hal ini ternyata memberikan angka LF sangat kecil yakni $1,5 \times 10^{-3}$ (0,15%) sampai 8×10^{-5} (0,008%) per generasi.

Artinya pada setiap 1500 sampai 800.000 generasi baru ada satu bakteri yang tidak mengandung plasmid R1.

Kaitan tingginya angka kejadian kebal antimikroba, khususnya kebal ampisilin dengan tingkat penggunaan antimikroba, telah banyak diulas oleh beberapa peneliti dengan beberapa penekanan sudut pandang. Antimikroba sulfonamid, tetrasiklin, streptomisin dan kloramfenikol yang sejak tahun 1950 dipakai di Jepang untuk terapi penyakit disentri, pada tahun 1957 ditemukan 2% populasi *Shigella spp* telah kebal salah satu antimikroba tersebut. Pada tahun 1960 angka ini menjadi 13%, bahkan telah ditemukan kejadian kebal ganda terhadap sulfonamid, tetrasiklin, streptomisin dan kloramfenikol pada 9% isolat. Perjalanan peningkatan kebal antimikroba pada *Shigella spp* dari tahun 1974 sampai 1982 dapat dilihat pada Gambar 6.1 (Hardy, 1986).

Di Inggris, dimana tetrasiklin mulai dipakai sebagai campuran makanan ayam dan ternak sebagai pemercepat pertumbuhan, ternyata berakibat peningkatan kejadian *Escherichia coli* flora ayam yang kebal tetrasiklin. Angka kejadian kebal tetrasiklin pada *Escherichia coli* yang semula hanya 3,5% pada tahun 1957, pada tahun 1958 meningkat menjadi 20,5%, tahun 1959 menjadi 40,9% dan pada tahun 1960 menjadi 63,2% (Hardy, 1986). Sejak dilakukan pembatasan penggunaan tetrasiklin sebagai campuran makanan ternak yang dimulai sejak tahun 1971, dan evaluasi dilakukan pada tahun 1975, ternyata hanya terjadi sedikit penurunan angka kejadian *Escherichia coli* kebal tetrasiklin, namun dari data ini tampak penurunan yang menonjol kekebalan yang diperankan plasmid dibanding yang tidak diperankan oleh plasmid. Hal ini menunjukkan bahwa angka kejadian plasmid pengkode kekebalan lebih peka dipergunakan sebagai petunjuk adanya tingkat penggunaan antimikroba dibanding kekebalan itu sendiri.

% Kebal antimikroba



Gambar 6.1. Kebal antimikroba pada *Shigella* spp, tahun 1974-1982.

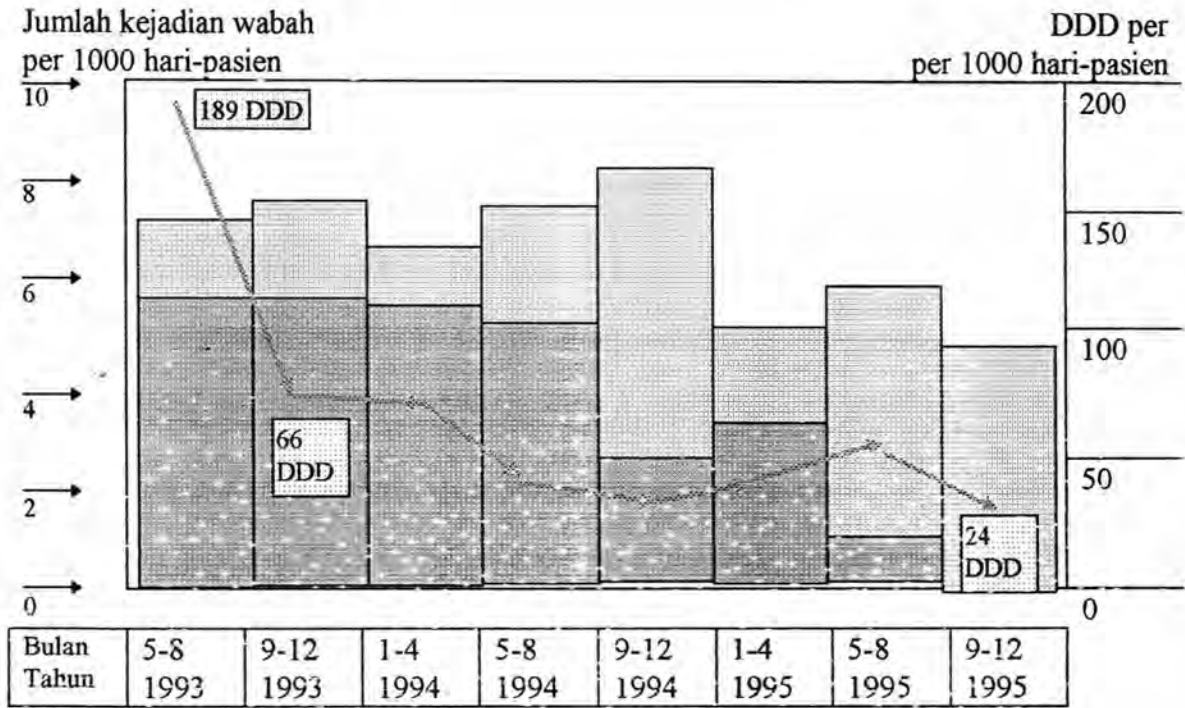
Keterangan: sulfo = sulfonamid; strep = streptomisin; tetra = tetrasiklin;
ampi = ampisilin; trime = trimetoprim

Keadaan serupa ini ternyata juga terjadi pada bakteri positif Gram. Penggunaan antimikroba golongan glikopeptid yakni avoparsin sebagai campuran makanan ternak, ternyata berakibat meningkatnya galur *Streptococcus faecium* yang kebal vankomisin (sering dikenal dengan nama *VRE = Vancomycin Resistant Enterococcus faecium*), antimikroba satu golongan dengan avoparsin. Kekebalan ini ternyata dibawa oleh transposon *Tn1546*. (Wegener *et al.*, 1999). Pada tahun 1994, penggunaan vankomisin untuk terapi di Denmark adalah sebanyak 24 kg, sedang penggunaan avoparsin sebagai perangsang pertumbuhan sebanyak 24.000 kg. Hal ini menunjukkan betapa pentingnya

peran penggunaan antimikroba pada hewan. Sejak pembatasan penggunaan avoparsin sebagai campuran makanan ternak di Denmark pada semester II tahun 1995, ternyata sejak itu, kejadian galur *VRE* menurun tajam, dari 82% menjadi 12% pada semester I tahun 1998.

Kekebalan terhadap golongan penisilin, khususnya yang diperankan oleh enzim penisilinase (atau beta laktamase), pertama kali dilaporkan pada tahun 1940 oleh Abraham dan Chain. Sedangkan plasmid yang berisi gen multiresisten pada bakteri pertama dlaporkan oleh Akiba, Koyama dan Ishiki pada *Shigella dysenteriae* di Jepang pada tahun 1959 (Dikutip dari Tenover and Hughes, 1996) , kemudian pada akhir tahun 1960 ditemukan gen multiresistan pada *Staphylococcus aureus*. Kaitan penggunaan antimikroba dengan peningkatan kebal antimikroba, khususnya yang diperankan oleh plasmid telah banyak laporan (Bently *et al.*, 1970; Damato *et al.*, 1974; Burman *et al.*, 1992; Arason *et al.*, 1996; Pena *et al.*, 1998). Pena *et al* (1998) dalam penelitiannya mendapatkan bahwa penderita yang dirawat di Unit Perawatan Intensip dimana obat utama yang dipergunakan adalah golongan sefalosporin, dari kasus infeksi yang terjadi pada 63% penderita, sebanyak 43% disebabkan oleh *Klebsiella pneumoniae* penghasil enzim beta laktamase. Bahkan diketahui bahwa enzim beta laktamase ini adalah jenis *ESBL* (*'Extended Spectrum Beta Lactamase'*) yang selain dapat merusak ampisilin, juga dapat merusak berbagai golongan sefalosporin generasi yang baru. Bahkan enzim ini juga dapat merusak obat moksalaktam (Poyart *et al.*, 1998). Pada penelitian Pena *et al* (1998) juga dilakukan penurunan penggunaan aniumikroba sefalosporin (seftasidim) secara bertahap selama 2 tahun sampai menjadi 1/8 kali. Ternyata hal ini berakibat menurunnya angka kejadian *Klebsiella pneumoniae* penghasil *ESBL*, sedangkan kejadian *Klebsiella*

pneumoniae bukan penghasil *ESBL* makin tinggi. Fakta ini menunjukkan bahwa dengan perubahan kekebalan yang tidak terlalu nyata, namun sudah menunjukkan perubahan angka kejadian plasmid penghasil *ESBL* yang nyata. (Gambar 6.2).



Gambar 6.2.

Angka kejadian *Klebsiella pneumoniae* kebal sefalosporin penghasil *ESBL* dan bukan penghasil *ESBL* di ruang Perawatan Intensip Rumah Sakit, setelah pembatasan penggunaan seftasidim (beta laktam oksimino) (Pena *et al.*, 1998)

Keterangan:

- = *Klebsiella pneumoniae* penghasil *ESBL* (*ESBL-KP*)
- = *Klebsiella pneumoniae* bukan penghasil *ESBL* (*Non-ESBL-KP*)
- = Penggunaan antimikroba beta laktam oksimino (seftriakson, seftaksim, seftasidim) dalam *DDD* (*Defined Daily Doses*).

Munculnya galur peka yang berasal dari bakteri kebal, setelah terbebas dari paparan antimikroba, pernah dilaporkan oleh Praseno (1994), dimana pada percobaan in

vitro dengan membiakkan pada media bebas antimikroba pada *Escherichia coli* kebal ganda, ternyata setelah 60 hari membiakkan, muncul galur peka.

Dari berbagai fakta di atas terlihat bahwa naik turunnya kejadian kebal antimikroba pada bakteri, mengikuti dan terkait dengan tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan. Hal ini khususnya kekebalan yang diperankan oleh plasmid, mempunyai kaitan lebih erat dibanding kekebalan yang tidak diperankan oleh plasmid.

Jika ditelaah tentang istilah pencemaran terhadap keberadaan plasmid pengkode kebal ampisilin, apakah istilah pencemaran ini tepat ?. Untuk itu peneliti mencoba menguraikan definisi pencemaran. Pencemaran adalah terdapatnya suatu bahan dalam konsentrasi yang besar atau yang sebelumnya tidak ada menjadi ada, pada suatu lingkungan hidup manusia (dapat fisik, biologik atau sosial), yang dihasilkan oleh proses aktifitas kehidupan manusia itu sendiri, yang akhirnya merugikan eksistensi manusia juga (Amsyari, 1986). Peneliti melihat tiga hal untuk dapat memberi istilah pencemaran yakni: 1). adanya bahan yang kadarnya menjadi besar atau dari tidak ada menjadi ada; 2). merugikan eksistensi manusia dan 3). terjadi akibat aktifitas manusia. Ternyata ketiga unsur ini sesuai dengan fungsi dan keberadaan plasmid pengkode kebal ampisilin. Pada suatu simposium masalah kekebalan antibiotika, dalam suatu diskusi, Raquero mengatakan bahwa para industri farmasi harus berani mengatakan bahwa dirinya adalah industri pencemar (*'pollutant industry'*) yang merubah lingkungan mikroba di bumi akibat pencemaran antibiotika (Giamarellou and Antoniadou, 1997).

Makin tingginya angka kejadian plasmid pengkode kekebalan, merupakan suatu kerugian bagi manusia dalam kaitan pemberantasan suatu penyakit infeksi. Kerugian ini

meliputi dua hal yakni: 1). Bakteri yang mengandung plasmid kekebalan, biasanya tidak dapat diatasi dengan antimikroba dosis tinggi karena mempunyai KHM derajat tinggi ('*High Level resistance*'), bahkan keberadaan antimikroba justru akan meningkatkan ekspresi dan replikasi plasmid (Adrian *et al.*, 1993; Pena *et al.*, 1998); 2). Plasmid kekebalan dapat berpindah ke bakteri lain, sehingga dapat merubah bakteri yang peka menjadi kebal (Christie & Dunny, 1984; Lambert *et al.*, 1988; Kitzis *et al.*, 1988; Rice *et al.*, 1992).

Jadi menurut peneliti, peningkatan keberadaan plasmid pengkode kebal antimikroba, sangat tepat dikatakan sebagai pencemar lingkungan, dan pencemaran plasmid itu sendiri dapat dipergunakan sebagai petunjuk penggunaan antimikroba di lingkungan

6.4 Ukuran Plasmid

Plasmid kekebalan telah dikenal secara luas sebagai plasmid dengan ukuran kecil, sekitar 15 kb. Gen yang berfungsi sebagai pengkode kekebalan terhadap ampisilin, yang kini banyak dijual dipasaran sebagai petanda rekayasa genetika, mempunyai ukuran sekitar 1,2 kb yang dirangkai dengan fungsi-fungsi lain sehingga menjadi plasmid dengan ukuran total beragam, misalnya pBR322 = 4,363 kb, pUC18/19 = 2,690 kb, pSP64 = 3 kb dan pGEM3/4 = 2,870 kb (Sambrook *et al.*, 1989). Camphell and Mee (1987) pada penelitian plasmid pengkode kebal trimetoprim, diketahui pada plasmid yang mempunyai ukuran 21,94 kb, 22,79 kb, dan 27,18 kb, ternyata yang berperan pada kebal trimetoprim adalah potongan gen dengan panjang 1,83 kb. Demikian juga dengan plasmid pengkode kebal tetrasiklin dengan ukuran sampai 46 kb, ternyata yang berperan terhadap kebal tetrasiklin

adalah potongan dengan ukuran 2,5 kb (Tenover *et al.*, 1987). Jadi gen penentu kekebalan itu secara sendiri adalah relatif kecil, kemudian makin panjang sesuai pengaruh lingkungan.

Pada penelaahan ukuran plasmid, telah dijelaskan bahwa dilakukan pembagian ukuran dalam tiga kelompok yakni kelompok 1, kelompok 2 dan kelompok 3. Berdasar penggolongan ini, maka jumlah plasmid kebal ampisilin dengan berat masing-masing untuk RP IKJ adalah 28 plasmid dengan berat kelompok 1, tidak ditemukan plasmid dengan ukuran kelompok 2 dan 3. Sedangkan untuk RP BU, 38 plasmid dengan berat kelompok 1, 10 plasmid dengan berat kelompok 2 dan 10 plasmid dengan berat kelompok 3. (Tabel 5.8 dan Tabel 5.9).

Ukuran plasmid yang makin besar, khususnya plasmid pengkode kebal antimikroba, dapat terjadi melalui dua mekanisme yakni: a). Proses dimerisasi plasmid karena paparan dan rangsangan antimikroba yang terus-menerus dan berkelanjutan dalam jangka waktu lama; b). Terjadinya penggabungan dengan plasmid-plasmid lain, khususnya plasmid dalam satu grup inkompatibilitas yang sama, yang kebetulan berada bersama dalam satu sel bakteri.

Proses dimerisasi plasmid yakni proses penggabungan beberapa plasmid yang sama, sehingga membentuk plasmid baru dengan ukuran menjadi kelipatan dua, tiga, empat, dan seterusnya sesuai dengan deret hitung. Hal ini pernah dilaporkan pada gen pengkode kebal eritromisin yang dipisahkan dari bakteri flora tinja babi yang makanannya diberi bahan tambahan antimikroba golongan makrolid (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Pada kejadian ini terjadi replikasi plasmid dan disertai dimerisasi plasmid sampai ukuran plasmid meningkat menjadi 16 kali lebih besar. Stryer (1988) mengatakan bahwa dimerisasi terjadi melalui penggabungan senyawa yang homolog dan kaya gugus AT (Adenin-Timin). Proses

dimerisasi ini makin dipermudah jika bakteri inang mempunyai gen *recA* yang menghasilkan protein yang sangat bermanfaat untuk proses rekombinasi (Brent and Ptashne, 1981; Little *et al.*, 1981; Stryer, 1988). Menurut peneliti, tingginya paparan ampisilin atau antimikroba golongan cincin beta laktam, akan berakibat ekspresi dan replikasi plasmid makin meningkat dengan salah satu akibat adalah terjadinya dimerisasi plasmid. Hal ini lebih nyata terlihat pada plasmid yang dipisahkan dari RP BU dibanding plasmid yang dipisahkan dari RP IKJ.

Kemungkinan lain adalah terjadinya penggabungan beberapa plasmid, khususnya plasmid pengkode kebal antimikroba yang berada dalam satu grup inkompatibilitas (*Incompatibility group*). Bahkan pernah dilaporkan penggabungan plasmid pengkode kebal ganda terhadap beberapa antimikroba, dengan plasmid yang berperan pada patogenitas *Escherichia coli* sehingga terbentuk plasmid dengan ukuran sangat besar sampai 140 kb (Jallat *et al.*, 1994). Dua atau lebih plasmid yang berada bersama dalam satu sel bakteri, akan mengalami dua kemungkinan, yakni tetap menyendiri kemudian keluar lagi dari sel atau menggabung satu terhadap yang lain. Adanya gen *rec*, makin meningkatkan kemungkinan rekombinasi dan kecil kemungkinan terjadi inkompatibilitas (Balganesh and Setlow, 1986). Pada suatu penelitian terhadap 20 plasmid pengkode kebal antimikroba, dimana tiap plasmid mengkode satu atau lebih antimikroba (yakni streptomisin, tetrasiklin, ampisilin, dan sulfatiasol) ternyata 20 plasmid ini terbagi menjadi 4 grup inkompatibilitas (Grant and Pittard, 1974). Hal ini berarti rata-rata 5 plasmid termasuk dalam satu grup inkompatibilitas, yang berarti akan mudah menggabung jika berada dalam satu sel bakteri yang sama. Sebagai contoh plasmid yang berada dalam satu grup inkompatibilitas dapat dilihat pada Tabel 6.1.

Praseno (1994) dalam penelitiannya mencoba membiakkan beberapa bakteri kebal ganda, dengan cara melakukan subkultur setiap hari selama 60 hari, dalam medium BHI ('*Brain Heart Infusion Broth*'). Ternyata terjadi perubahan dari kebal menjadi peka berikut ini: 1). pada hari ke 20, *Klebsiella spp* menjadi peka terhadap kloramfenikol; 2). pada hari ke 40, *Shigella spp* menjadi peka terhadap sulfametoksazol, dan 3). pada hari ke 60 *Escherichia coli* menjadi peka terhadap tetrasiklin. Hal ini diperkirakan ada plasmid yang lepas karena tidak ada faktor seleksi, sehingga kemungkinan terjadinya penggabungan plasmid menjadi kecil, atau makin kecil kemungkinan plasmid untuk menjadi bertambah panjang..

Tabel 6.1.

Plasmid pengkode kebal antimikroba isolat dari *Escherichia coli* yang berasal dari tinja hewan (iembu, ayam, babi) yang tergolong dalam satu grup inkompatibilitas.

Galur <i>Escherichia coli</i>	Kebal antimikroba yang dikode
1. JP819	Sm
2. JP820	Sm, Tc
3. JP821	Tc
4. JP822	Sm, Tc
5. JP826	Tc, Ap
6. JP881	Sm, Su

Keterangan: JP = kode peneliti yang tidak ada penjelasan

Sm = Streptomisin; Tc = Tetrasiklin; Ap = Ampisilin;

Su = Sulfatiasol

Perubahan ukuran gen telah pula dilaporkan terjadi pada kromosom *Escherichia coli*, akibat paparan ampisilin. Pada galur mutan akibat paparan ampisilin, dimana terjadi peningkatan KHM dari 1 mikrogram per mililiter menjadi 100 mikrogram per mililiter, ternyata hal ini diakibatkan oleh peningkatan produksi enzim beta laktamase. Pada

penelaahan gen *ampC* pada kromosom yang berperan pada produksi enzim beta laktamase, ternyata terjadi perpanjangan ukuran gen *ampC* tersebut. Perpanjangan gen ini terjadi melalui pengulangan gen ('*gene repetition*') (Normark *et al.*, 1977). Peningkatan ukuran gen ini berkaitan dengan peningkatan produksi enzim beta laktamase. Namun diketahui pula bahwa pada galur mutan kebal 100 mikrogram ampisilin per militer pada penelitian tersebut, mempunyai ukuran gen *ampC* yang berbeda. Jadi peningkatan pengulangan panjang gen, tidak diikuti peningkatan pengulangan yang sama terhadap produksi enzim beta laktamase. Hal ini mirip yang ditemukan oleh DeGuglielmo *et al* (1991) dimana kenaikan ukuran plasmid pengkode kebal eritromisin sampai 16 kali, namun hanya terjadi peningkatan KHM dua kali.

Fukukawa *et al* (1993) telah melakukan pengamatan terhadap plasmid pencerna detergen atau bahan xenobiotik ('*Xenobiotic = Man made compounds*'). Bakteri yang mengandung plasmid yang berisi gen *bph* hanya dapat mencerna detergen golongan bifenil, sedang plasmid yang berisi gen *tod* hanya dapat mencerna detergen golongan toluen. Kedua plasmid secara sendiri-sendiri tidak dapat mencerna detergen trikloroetilen. Jika gen *bph* dan gen *tod* digabung dalam satu plasmid, ternyata plasmid yang berisi gen gabungan ini dapat mencerna ketiga detergen diatas. Pencernaan detergen trikloroetilen oleh gabungan dua gen yang berasal dari dua plasmid ini oleh Minshull (1995) diberi istilah penghancuran oleh konsorsium mikroba ('*Degrade by a consotium of Microorganisms*'). Kejadian ini dikatakan sebagai tahapan evolusi horisontal. Jadi keberadaan plasmid baru yang merupakan gabungan dari dua gen tersebut mempunyai kemampuan lebih dibanding masing-masing gen. Kemampuan menggabung ini kiranya juga dapat terjadi pada gen-gen pengkode kebal antimikroba. Hal ini seperti yang terjadi pada galur mutan *Escherichia*

coli, dimana peningkatan kekebalan terhadap ampisilin adalah akibat peningkatan produksi enzim beta laktamase, dan hal ini disertai bocornya enzim tersebut keluar ruang periplasmik. Ternyata kebocoran akibat gangguan pada dinding sel bakteri ini, berpengaruh pula terhadap antimikroba lain, yakni peningkatan kekebalan terhadap kanamisin, streptomisin dan kloramfenikol (Norstrom *et al.*, 1970).

6.5 Tipe Plasmid Berdasar Gen Kebal Antimikroba (selain ampisilin) Sebagai Gen Penyerta, Berdasar Antibiogram pada Sel Transforman

Tipe plasmid, suatu penggolongan yang dibuat peneliti berdasar adanya gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin pada sel transforman, menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kedua lokasi penelitian. Jika dianalisis satu persatu adanya gen penyerta tersebut, diketahui bahwa dari 28 isolat plasmid dari RP IKJ, 3 galur (10,7%) mengandung gen kebal kloramfenikol, 3 galur (10,7%) mengandung gen kebal trimetoprim, sedangkan gen kebal sulbenisilin ada pada semua plasmid. Sedangkan plasmid isolat dari RP BU, 4 galur (6,9%) mengandung gen kebal eritromisin, 4 galur (6,9%) mengandung gen kebal kanamisin, 6 galur (10,35%) mengandung gen kebal kloramfenikol, 10 galur (17,24%) mengandung gen kebal trimetoprim dan gen pengkode kebal sulbenisilin ada pada semua isolat plasmid. (Tabel 6.2).

Tidak adanya perbedaan tipe plasmid antara kedua lokasi penelitian, menurut peneliti karena beberapa faktor seperti:

- a. Tingkat penggunaan antimikroba (selain golongan cincin beta laktam) tidak ada beda antara kedua lokasi penelitian, ataupun kalau ada, terlalu kecil untuk dapat melakukan suatu proses seleksi atau sensitisasi.

- b. Jika plasmid pengkode kebal terhadap antimikroba selain ampisilin tersebut ada, kemungkinan hanya sebagian kecil yang masuk dalam satu grup inkompatibilitas dengan plasmid pengkode kebal ampisilin, sehingga sebagian besar akan keluar lagi dari sel akibat sensitisasi oleh ampisilin.
- c. Adanya plasmid dari luar rumah sakit atau dari ruangan lain di dalam rumah sakit, dengan beragam jenis plasmid, kemudian mengalami sensitisasi dan penggabungan di dalam lokasi penelitian di rumah sakit juga merupakan salah satu faktor yang perlu dipertimbangkan.

Tabel 6.2

Angka kejadian ekspresi gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin yang tergabung dalam plasmid pengkode kebal ampisilin

Kebal antimikroba yang dikode	RSUD Dr. Soetomo Surabaya			
	RP IKJ		RP BU	
	Jumlah	Prosen	Jumlah	Prosen
1. Eritromisin	-		4	6,90
2. Kanamisin	-		4	6,90
3. Kloramfenikol	3	10,70	6	10,35
4. Trimetoprim	3	10,70	10	17,24
5. Sulbenisilin	28	100,00	58	100,00

Pada penelaahan penggunaan antimikroba selain golongan cincin beta laktam selama penelitian, diketahui bahwa tingkat penggunaan obat tersebut cukup rendah, baik frekuensi maupun kadar obat rata-rata per penderita. (Tabel 6.3).

Untuk dapat mengetahui lebih jelas kiranya perlu penelitian tersendiri dengan sasaran pokok adalah plasmid pengkode antimikroba tersebut (selain ampisilin), dengan seleksi awal pada transformasi juga adalah antimikroba yang bersangkutan. Misalnya

seleksi menggunakan kloramfenikol untuk mencari plasmid pengkode kebal kloramfenikol dan seterusnya. Pada famili *Enterobacteriaceae* telah dikenal ada 25 grup inkompatibilitas plasmid. Inkompatibilitas plasmid biasanya terjadi karena tiga hal (Hardy, 1986) yakni: 1). Plasmid yang satu menghasilkan protein represor (misalnya protein RNA I) terhadap protein replikon (misalnya protein repA1) plasmid lain; 2). Saat replikasi plasmid, dibutuhkan membrane bakteri sebagai tempat melekat. Tempat perlekatan ini adalah spesifik dan jumlahnya terbatas. Jika ada satu plasmid dalam jumlah besar telah melekat pada membran sel, maka plasmid lain tidak mendapatkan tempat lagi dan melepas dari sel; 3). Salah satu syarat agar bakteri dapat bertahan dalam generasi berikutnya, adalah harus dapat melekat pada membrane sel, sebagai tahapan masuk ke generasi baru. Ketidakmampuan melekat pada membran sel, akan menurunkan kesempatan bakteri dapat masuk dalam generasi bakteri yang baru, sebagai hasil perkembang-biakan, sehingga plasmid melepas dari sel bakteri.

Tabel 6.3

Tingkat penggunaan antimikroba selain golongan cincin beta laktam di RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Antimikroba	RSUD Dr. Soetomo Surabaya					
	RP IKJ			RP BU		
	Jml Px	Berat	Berat M	Jml Px	Berat	Berat M
1. Aminoglikosida	4	1,24	0,0073	21	9,23	0,048
2. Kloramfenikol	-	-	-	1	24	0,1244
3. Kotrimoksazol	1	4,9	0,03	1	1,92	0,01
4. Rifampisin	-	-	-	1	4,050	0,021
5. Tetrasiklin	1	4,5	0,027	-	-	-
6. Eritromisin	-	-	-	-	-	-

Keterangan: Jumlah penderita total adalah RP IKJ = 169 orang; RP BU = 193 orang

Jml Px = Jumlah penderita yang mendapat antimikroba

Berat = Berat (gram) total antimikroba yang diberikan pada penderita

Berat_M = Berat (gram) rata-rata antimikroba per penderita

Pada suatu penelitian tentang plasmid pengkode kebal trimetoprim pada 357 galur bakteri flora tinja manusia, pernah dilaporkan bahwa terjadi penggabungan gen-gen pengkode kebal antimikroba yang lain, yang meliputi jumlah 1 sampai 9 gen pengkode kebal antimikroba (Adrian *et al.*, 1993). Pada penelitian tersebut telah berhasil dipisahkan sebanyak 184 isolat plasmid pengkode kebal trimetoprim. Dari jumlah ini ternyata 30% mengandung gen pengkode kebal tetrasiklin, 56,6% mengandung gen kebal ampisilin, 0,5% mengandung gen kebal sefotaksim, 2,6% mengandung gen kebal gentamisin dan 11,7% mengandung gen kebal kloramfenikol. Adanya gen yang saling menggabung ini, merupakan penyebab sensitisasi silang antara antimikroba dengan golongan atau jenis berbeda. Arason *et al* (1996) pada penelitian tentang penggunaan kotrimoksazol (antimikroba yang berisi sulfametoksazol dan trimetoprim) pada masyarakat, ternyata pada kelompok pemakai kotrimoksazol terjadi peningkatan yang bermakna terhadap angka kejadian *Pneumococcus* yang kebal penisilin. Jika dilihat pada kedua data penelitian tersebut terlihat kedekatan kebersamaan yang bersifat relatif antara gen kebal ampisiin dan gen kebal trimetroprim.

Adanya beragam gen penyerta pada penelitian Adrian *et al* (1993) dan pada penelitian di RSUD Dr. Soetomo Surabaya tersebut, menurut peneliti sangat berkait dengan sejarah perjalanan penggunaan antimikroba di lingkungan tersebut atau lingkungan lain dimana bakteri flora limbah berasal. Pernah dilaporkan adanya plasmid pengkode kekebalan terhadap makrolid-linkosamid-streptogramin B (MLS) pada *Escherichia coli* penyebab penyakit infeksi pada manusia, padahal obat tersebut tidak dipergunakan pada manusia. Ternyata plasmid ini berasal dari streptokokus yang berasal dari babi, dimana obat tersebut dipergunakan sebagai bahan tambahan pada

makanan babi tersebut (Christie and Dunny, 1984). Jadi keberadaan plasmid di rumah sakit, tidak dapat sepenuhnya terlepas dari plasmid di tempat lain atau di luar rumah sakit. Sedangkan tentang sulbenisilin, dimana semua gen kebal ampisilin juga kebal sulbenisilin, hal ini kemungkinan adalah mekanisme kerja kekebalan sama antara ampisilin dan sulbenisilin. Telah diketahui bahwa sulbenisilin adalah penisilin semisintetik yang merupakan grup penisilin, dan telah diketahui pula bahwa sulbenisilin secara umum bersifat peka terhadap enzim beta-laktamase. Jadi plasmid pengkode kebal ampisilin ini menurut peneliti mengandung gen pengkode enzim beta laktamase yang juga dapat merusak sulbenisilin.

Jika dilakukan analisis jumlah gen kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin) pada tiap tipe plasmid, dimana plasmid tipe 1 ada 4 gen penyerta, plasmid tipe 2 ada 3 gen penyerta dan plasmid tipe 3 mengandung 1 gen; ternyata **tidak ada beda bermakna** jumlah gen pengkode kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin), antara kedua lokasi penelitian dengan nilai $p= 0.3822$. Pada uji korelasi antara ukuran plasmid dan banyaknya gen pengkode kebal antimikroba, ternyata tidak ada korelasi bermakna ($r=0,0717$). Hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya ukuran plasmid, tidak diakibatkan oleh bergabungnya (rekombinasi) plasmid lain yang mengandung gen pengkode kebal antimikroba selain ampisilin. Menurut peneliti, makin panjangnya ukuran plasmid ini lebih disebabkan oleh mekanisme dimerisasi plasmid (DeGuglielmo *et al.*, 1991) atau karena pengulangan gen ('*gene repetition*') (Normark *et al.*, 1977). Kemungkinan lain adalah rekombinasi dengan plasmid lain, tapi yang hanya berisi gen pengkode kebal ampisilin saja dan tidak berisi gen pengkode kebal nir-ampisilin.

6.6 Rangkuman Pembahasan

Berbagai laporan menunjukkan bahwa kekebalan bakteri terhadap antimikroba, tidak hanya disebabkan oleh suatu paparan antimikroba saja, namun juga oleh paparan bahan non-antimikroba. Paparan bahan non-antimikroba ini dapat dilihat pada kasus meningkatnya kekebalan bakteri akibat berada dalam lingkungan dengan tekanan osmotik tinggi (Barron *et al.*, 1986), maupun terpapar oleh bahan salisilat (Kunin *et al.*, 1991), disamping banyak bahan lain. Banyaknya faktor konfonding ini yang dapat memberi kesimpulan salah tentang munculnya kekebalan bakteri dalam kaitan dengan faktor paparan dengan antimikroba. Sebagai contoh kekebalan yang diakibatkan perubahan komponen dinding sel bakteri akibat pengaruh tekanan osmotik tinggi, tidak akan ada perubahan genetik yang spesifik pada bakteri yang bersangkutan. Walaupun ada perubahan genetik, lebih bersifat umum dan pengaruhnya juga berlaku secara umum terhadap berbagai antimikroba (Baron *et al.*, 1986; Komatsu *et al.*, 1991; Kunin *et al.*, 1994). Hal ini berbeda dengan keberadaan plasmid pengkode kebal ampisilin, yang selalu diikuti munculnya bakteri kebal ampisilin, ada maupun tidak ada perubahan struktur dinding sel bakteri. Hal ini yang menyebabkan tidak adanya perbedaan pola kekebalan antara dua tempat, walau dengan perbedaan tingkat penggunaan antimikroba (ampisilin/golongan cincin beta laktam) yang tinggi.

Plasmid kekebalan yang berisi gen pengkode kekebalan terhadap antimikroba, hanya dipengaruhi oleh paparan antimikroba yang bersangkutan dan tidak banyak dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang lain. Terdapatnya plasmid pengkode kebal ampisilin, selalu berkaitan dengan adanya paparan antimikroba ampisilin atau antimikroba sejenis dalam kelompok ampisilin, yakni golongan obat dengan inti cincin beta laktam.

Adanya plasmid kekebalan terhadap ampisilin, dipastikan bahwa bakteri menjadi kebal terhadap ampisilin. Namun adanya bakteri yang kebal terhadap ampisilin, tidak selalu mempunyai plasmid pengkode kebal ampisilin, tetapi dapat karena perubahan struktur dinding sel bakteri akibat pengaruh bahan selain ampisilin (Baron *et al.*, 1986; Komatsu *et al.*, 1991; Kunin *et al.*, 1994). Mekanisme ini menunjukkan kedekatan keterkaitan antara plasmid pengkode kebal ampisilin dengan paparan ampisilin dibanding kekebalan bakteri terhadap paparan ampisilin, seperti yang dihasilkan dalam penelitian ini.

Perubahan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin, juga sangat berkaitan dengan tingkat paparan ampisilin atau obat sejenis ampisilin yang termasuk di dalam kelompok antimikroba dengan inti cincin beta laktam. Hal ini karena adanya sensitisasi silang antara obat dalam satu golongan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada keterkaitan peningkatan kekebalan bakteri terhadap ampisilin dengan peningkatan ukuran gen pengkode kebal ampisilin (Normark *et al.*, 1977; DeGuglielmo *et al.*, 1991). Namun peningkatan ukuran gen tersebut tidak berbanding lurus dengan peningkatan kekebalan terhadap ampisilin. Dilaporkan adanya peningkatan KHM kekebalan yang sama, namun terjadi peningkatan ukuran gen yang berbeda (Normark *et al.*, 1977). Dilaporkan juga adanya peningkatan ukuran plasmid sampai 16 kali namun peningkatan KHM hanya dua kali (DeGuglielmo *et al.*, 1991). Keterkaitan ukuran plasmid dengan tingginya KHM sampai saat belum banyak laporan, bahkan belum pernah ada penelitian khusus yang menganalisis kaitan antara ukuran plasmid dengan tingginya KHM. Namun kekebalan yang dikode plasmid pada umumnya mempunyai KHM yang tinggi atau sangat tinggi (Adrian *et al.*, 1993). Untuk KHM kekebalan terhadap antimikroba yang diperankan oleh gen dalam kromosom, juga belum banyak laporan. Pada *Escherichia coli* galur K-12, yang

mempunyai gen *amp^C* pengkode kebal ampisilin, ternyata mempunyai KHM 1 mikrogram per mililiter, suatu batas yang menunjukkan bakteri tersebut sangat peka terhadap ampisilin. Setelah dilakukan paparan dengan ampisilin, muncul galur baru dengan berbagai KHM mulai 4 mikrogram per mililiter sampai 100 mikrogram per ml (Normark *et al.*, 1977).

Peningkatan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin ternyata juga tidak ada korelasi dengan banyaknya gen pengkode antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin) atau bergabungnya gen atau plasmid pengkode kebal antimikroba selain ampisilin. Jadi walaupun masuknya gen lain tersebut akan meningkatkan ukuran plasmid, namun peningkatan ukuran plasmid ini lebih disebabkan oleh faktor lain, dan menurut peneliti hal ini karena adanya pengulangan gen (*'gene repetition'*) (Normark *et al.*, 1977) atau adanya dimerisasi plasmid itu sendiri seperti yang pernah dilaporkan oleh DeGuglielmo *et al.* (1991). Jika terjadi rekombinasi hanya terbatas dengan plasmid yang hanya berisi gen pengkode kebal ampisilin saja. Keadaan ini mungkin juga karena berbagai plasmid pengkode kebal nir-ampisilin lain di lingkungan tersebut sebagian besar bersifat inkompatibel (*'incompatible'*), sehingga sulit melakukan rekombinasi atau penggabungan dengan plasmid pengkode kebal ampisilin. Kemungkinan lain, galur *Escherichia coli* di lingkungan tersebut hanya sedikit yang memiliki gen *recA* yang fungsi utamanya memfasilitasi terjadinya rekombinasi antar DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Adanya kedekatan keterkaitan angka kejadian maupun ukuran plasmid pengkode kebal antimikroba (ampisilin) terhadap tingginya penggunaan antimikroba (ampisilin/ golongan cincin beta laktam), menunjukkan pentingnya parameter plasmid untuk dapat dipergunakan sebagai petunjuk tingkat penggunaan antimikroba pada suatu lingkungan.

Dengan model plasmid pengkode kebal ampisilin ini, dapat dikembangkan untuk antimikroba lain.

Sedangkan tipe plasmid yang sama antara kedua lingkungan, menunjukkan bahwa timbulnya kebal ganda ('antimicrobial multi tresistance') pada bakteri, tidak terkait dengan tinggi atau rendahnya tingkat penggunaan antimikroba, namun disebabkan oleh hal lain yang masih perlu dicari penyebabnya.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Penggunaan antimikroba golongan cincin beta laktam khususnya ampisilin, di RP BU lebih tinggi dibanding penggunaan di RP IKJ.

Tingkat kekebalan *Escherichia coli* di kedua lokasi penelitian sudah sangat tinggi, dan tidak ada beda antara kedua lokasi penelitian. Namun pada pengamatan angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin isolat dari *Escherichia coli* yang berasal dari RP BU lebih tinggi dibanding isolat yang berasal dari RP IKJ.

Ukuran plasmid yang berasal dari RP BU, lebih besar dibanding plasmid yang berasal dari RP IKJ. Sedangkan pengamatan tipe plasmid yang didasarkan pada banyaknya ekspresi gen kebal antimikroba (ampisilin dan nir-ampisilin), tidak ada beda antara kedua lokasi penelitian. Juga tidak ada korelasi antara ukuran plasmid dengan banyaknya gen pengkode kebal antimikroba tiap plasmid. Fakta ini menunjukkan bertambah besarnya ukuran plasmid tidak disebabkan oleh bergabungnya gen pengkode kebal nir-ampisilin.

Dari semua fakta di atas, menunjukkan bahwa:

- 1). Angka kejadian dan karakter pasmid pengkode kebal antimikroba (ampisilin), dapat dipergunakan sebagai petunjuk tingkat penggunaan antimikroba (ampisilin/golongan cincin beta laktam) di lingkungan. Penggunaan antimikroba yang berlebihan, bisa mengakibatkan penyebaran kekebalan terhadap antimikroba.
- 2). Bakteri limbah dapat dipergunakan sebagai petanda (indikator) tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan, khususnya di rumah sakit, yang sangat berkaitan dengan pola kekebalan bakteri di rumah sakit. Dengan dapat dimanfaatkannya bakteri limbah,

maka untuk penentua pola kepekaan dapat dilakukan tanpa harus menunggu isolat bakteri yang berasal dari penderita.

- 3). Kejadian kebal ganda (*'antimicrobial multi resistance'*) tidak berkait dengan tinggi atau rendahnya tingkat penggunaan antimikroba, tetapi karena hal lain yang masih perlu dicari penyebabnya.

7.2 Saran

7.2.1 Saran pengembangan lebih lanjut

Dilakukan karakterisasi lebih lanjut dengan pendekatan lain terhadap plasmid pengkode kebal ampisilin pada spesies bakteri yang telah diidentifikasi, yakni melalui sidik jari plasmid (*'Plasmid finger printing'*), dan dilakukan pada bakteri limbah dari berbagai lokasi dengan berbagai tingkat penggunaan antimikroba. Hal ini dalam jangkauan ke depan diharapkan dapat menjadi alat pelacak sumber infeksi nosokomial atau sumber wabah melalui paradikma bakteri (saat ini masih menggunakan paradigma klinik), khususnya melalui peran plasmid.

7.2.2. Saran penerapan praktis

Kebal antimikroba pada limbah rumah sakit, dapat mencerminkan tingkat penggunaan antimikroba yang sangat berkaitan dengan pola kekebalan bakteri di lingkungan rumah sakit. Karena itu dalam kaitan penentuan kebijakan penggunaan antimikroba, khususnya untuk pemberantasan infeksi nosokomial, penentuan pola kekebalan bakteri rumah sakit dapat dilakukan menggunakan bakteri limbahi, sehingga tidak harus menunggu isolat dari penderita.

DAFTAR PUSTAKA

- Acar, JF. and Goldstein, FW. 1998. Consequence of Increasing resistance to Antimicrobial Agents. *Clin Infect Dis*; 27 (Suppl 1):S125-130.
- Adrian, PV., Koornhof, HJ., Wylie, BA. 1993. Trimethoprim Resistance in South African Isolates of Aerobic Gram-Negative. *Faecal Flora. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 12(12):916-921.
- Allard, J.D. and Bertrand, K.P. 1992. Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein. TetA-PhoA gene fusions and implications for the mechanism of TetA membrane insertion. *J. Biol. Chem.* ;267(25):17809-17819.
- Amsyari, F. (1986). Pencemaran Hidup Lingkungan manusia. Prinsip Masalah Pencemaran Lingkungan. Percetakan Ghalia Indonesia: 48-62.
- Arason, VA., Kristinsson, KG., Sigurdsson, JA., Stefandottir, G., Moldstad, S. and Gudmundsson, S. 1996. Do Antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in Children ?. Cross sectional prevalence study. *BMJ*; 313 (7054): 387-391.
- Balganesh, M., L. Arrigoni, and Setlow, J.K. (1986). Plasmid to Chromosome Gene Transfer in *Haemophilus influenzae* During Growth. *J. Bacteriol.*; 168(1), Oct.: 458-9.
- Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. 1994. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, Ninth Ed. CV. Mosby, Toronto.
- Barron A, May G, Bremer E and Villarejo M. 1986. Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*; 167(2):433-8.
- Bennett, P.M. 1992. Transposable elements. In: Lederberg, J. *Encyclopedia of Microbiology*; 4, S-Z:311-325.
- Bentley, D.W., Hahn, J.J. and Lepper, M.H. 1970. Transmission of chloramphenicol-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Epidemiologic and laboratory studies. *J. Infect. Dis.*; 122(5):365-375.
- Brent R and Ptashne M. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78, 7:4204-8.

- Bonnassie, S., Burini, J.F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.C. and Sicard, A.M. 1990. Transfer of Plasmid Bacteria to *Brevibacterium lactofermentum* by Electrotransformation. *J. Gen. Microb.*; 136:2107-12.
- Burman, L.G., Haeggman, S., Kuistila, M., Tullus, K. and Huovinen, P. 1992. Epidemiology of Plasmid-Mediated β -Lactamases in Enterobacteria in Swedish Neonatal Wards and Relation to Antimicrobial Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 36(5):989-992.
- Burns, J.L. and Clark, D.K. 1992. Salicylate-Inducible antibiotic resistance in *Pseudomonas cepacia* associated with absence of a pore-forming outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 36(10):280-2285.
- Campbell, I.G. and Mee, B.J. 1987. Mapping trimethoprim resistance genes from epidemiologically related plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* ;31(9):1440-1441.
- Chaslus-Dancla, E., Pohl, P., Meurisse, M., Marin, M. and Lafont, J.P. 1991. High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 35(3):590-593.
- Christie, P.J. and Dunny, G.M. 1984. Antibiotic selection pressure resulting in multiple antibiotic resistance and localization of resistance determinants to conjugative plasmids in Streptococci. *J. Infect. Dis.*; 149(1):74-82.
- Clairoux, N., Picard, M., Brochu, A., Rousseau, N., Gourde, P., Beauchamp, D., Parr, T.R. Jr, Bergeron, M.G., and Malonin, F. 1992. Molecular basis of the non beta lactamase mediated resistance to beta lactam antibiotics in strain of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 36(7):1504-1513.
- Cooksey, R.C. 1991. Mechanism of resistance to antibacterial agents. In: Balows A, Haudeer WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Fifth Ed., Chapter 109, American Society for Microbiology, Washington DC:1099-1104.
- Damato, J.J., Eitzman, D.V. and Boer, H. 1974. Persistence and dissemination in the community of R factors of nosocomial origin. *J. Infect. Dis.*; 129(2):205-209.
- Davis, B.D. 1982. Contributions to biology from studies on bacterial resistance. In: Mitsuhashi S (Ed). *Drug Resistance in Bacteria, Genetic, Biochemistry and Molecular Biology*. Japan Scientific Societies, Tokyo, Thieme-stratton Inc. New York:327-332.

- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S. 1990. Chemotherapy. Chapter 10. Microbiology, Fourth Ed. Herper & Row Publisher, Singapore:201-228.
- Dawson-Saunders, B. and Trap, R.G. 1994. Probability and related topics. Basic & Clinical Biostatistics, Second Ed, Chapter 5 Lange Medical Book:64-81.
- DeGuglieimo,MA., CG. George, and WE. Kloos. (1991). Selection of Colony, Plasmid and Virulence Variants of Staphylococcus epidermidis NRC853 during Growth in Continous Culture Exposed to Erythromycin. *Appl. Env. Microb.*; 57(4): 1018-25.
- Dever, L.A. and Dermody, T.S. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.*;151(5): 886-895.
- Farrar Jr, WE. 1983. Molecular Analysis of Plasmids in Epidemiologic Investigation. *J. Infect. Dis.*; 148(1):1-6.
- Flaherty, J.F. and Gambertoglio, J.G. 1990. Antibiotic. In: Williams, R.L., Brater, D.C., Mordenti, J. Rational Therapeutic. A Clinical pharmacologic guide for the health professional. Marcel Dekker Inc. New York:465-522.
- Fukukawa, K., Hayashida, S. 1993. Gene component responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon). *J. Bacteriol.*; 175:5224-32.
- Gaïlis, H.A. 1980. Microbial ecology and normal flora of the human body. In: Joklik WK, Willet HP, Amos BD. Zinsser Microbiology, 17th Ed. Appleton Century Crofs. New York:522-531.
- Giamarellou, H. And Antoniadou, A. 1997. Antibiotic resistance: Origins, evolution, selection and spread. *Ciba Foundation Symposium* 207, Wiley Chichester:76-92.
- Goldman, D.A., Durbin Jr, W A. and Freeman, J. 1981. Nosocomial infection in a Neonatal Care Unit. *J. Infect. Dis.*; 144(5):449-459.
- Grant, AJ. and Pittard, J. 1974. Incompatibility Reactions of R Plasmids Isolated from *Echerichia coli* of Animal Origin. *J. Bacteriol.*; 120(1):185-190.
- Guggenbichler, J.P. and Kofler, J. 1984. Influence of third generation cephalosporins on aerobic intestinal flora. *J. Antimicrob. Chemother.*;14 Suppl.B:67-70.
- Guiney Jr, D.G. 1984. Promiscuous transfer of drug resistance in Gram negative bacteria. *J. Infect. Dis.*; 149(3): 320-329.

- Hansen, L.M., McMurry, L.M., Levy, S.B. and Hirsh, D.C. 1993. A new tetracycline resistant determinant, TetH, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.*;37(12):2699-2705.
- Hardy, K. 1986. *Bacterial Plasmids*, Second Ed. American Society for Microbiology.
- Hotta, K., Ishikawa, J., Ogata, T. and Mizuno, S. 1992. Secondary amino glycoside producing strains of *Streptomyces*. *Gene*;115(1-2):113-117.
- Hudson, RE. And Michod, RE. 1992. Genetic Transformation, Evolution. In: Lederberg, J. (Eds). *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press Inc., Vol. 2, D-L:289-297.
- Itoh, K. and Freter, R. 1989. Control of *Escherichia coli* populations by a combination of indigenous *Clostridia* and *Lactobacilli* in gnotobiotic mice and continuous-flow culture. *Infect. Immun.*;57(2):559-565.
- Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Girardeau, J.P., Rick, C. and Joly, B. 1994. Self transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli*, strains isolated from diarrheal stool. *Infect. Immun.*;62(7): 2865-2873.
- Janas. 1984. Infeksi Nosokomial. Dalam: Soerachmad, S., Sutoto, K. Josodipoero. *Kumpulan Makalah Penataran Isolasi Penderita Penyakit Menular*. DepKes RI, Jakarta:21-36.
- Kinjo, T., Minamata, N., Sugiyana, M. and Sugiyama, Y. 1992. Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in wild and captive Japanese serows. *J. Vet. Med. Sci.*; 54(5):821-827.
- Kitzis, M.D., Billot-Klein, D., Goldstein, F.W., Williamson, R., van Nhien, G.T., Carlet, G., Acar, J.F. and Gutmann, L. 1988. Dissemination of the novel plasmid-mediated beta lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 32(1):9-14.
- Komatsu, T., Ohta, M., Kido, N., Arakawa, Y., Ito, H. and Kato, N. 1991. Increased resistance to multiple drugs by introduction of the *Enterobacter cloacae* romA gene into *OmpF* porin-deficient mutant of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.*;35(10):2155-2158.
- Kucers, A., Bennett, NM. 1982. *The use of antibiotics*. Fourth Ed., William Henemann. Medical Books, London: 172-245
- Kunin, C.H., Hua, T.H., Guerrant, R.L. and Bakaletz, L.O. 1994. Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on expression of fimbriae by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*;62(6):2178-2186.

- Kuntaman, Rachman, N., Ghozali, E.W. and Yuwono, T.A. 1996 (1). Pola penggunaan obat antimikroba dan non antimikroba di ruang rawat inap Lab./UPF. Ilmu Kedokteran Jiwa RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Media IDI Cabang Surabaya*; 21(1):22-25.
- Kuntaman, Rachman, N. dan Hardjowijoto, S. 1996 (2). Pola penggunaan antimikroba di ruang rawat inap Bedah Urologi RSUD. Dr. Soetomo Surabaya. *Majalah Teknologi Kedokteran Indonesia*; XI(1):6-12.
- Kuntaman. 1997. Profil kekebalan bakteri flora usus sebagai petunjuk tingkat penggunaan antimikroba di lingkungan. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Kuntaman. 1999. Daya tumbuh sel transforman *Escherichia coli* DH5 α pada media Luria Bertani dan macConkey. *Media IDI Cabang Surabaya*; 1 24(1): 4-6.
- Lambert, T., Gerband, G. and Courvalin, P. 1988. Transferable amikasin resistance in *Acinetobacter* spp. Due to a new type of 3'-Aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 32(1):15-19.
- Lan, C. and Igo, MM. 1998. Differential expression of the OmpF and OmpC Porin Protein in *Escherichia coli* K-12 Depends upon the Level of Active OmpR. *J. Bacteriol.*; 180(1): 171-174.
- Little JW, Mount DW and Yanisch-Perron CR. 1981. Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, July; 78(7):4199-4203.
- Massova, I. And Mobashery, S. 1998. Kinship and Diversification of Bacterial penicillin Binding Proetins and β -lactarnases. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 142(1): 1-17.
- Miller, J.H. 1992. The Lac System. A Sort course in bacterial genetics. A Laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Unit 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Printed in the United States of America: 19-80.
- Minshull. 1995. Cleaning Up our own Backyard: developing new catabolic pathways to degrade pollutants. *Chemistry & Biology*, December; 2:775-80.
- Munaf, S. 1992. Pola Penggunaan antibiotika di empat puskesmas Kotamadya Palembang dan dua Puskesmas di dua Kabupaten, Provinsi Sumatra Selatan. *MKI*; 43(9):507-511.
- Munro, S. 1992. Disk Diffusion Susceptibility testing. In: Isenberg, HD. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. American Society for Microbiology, Washington DC, Vol 1:5.1.1-5.1.29.

- Nakata, Y, Tang, X and Yokohama, K. 1997. Preparation of Competent Cells for High Efficiency Plasmid transformation of *Escherichia coli*. In: Cowell IG and Austin CA (Eds). *Methods in Molecular Biology*, Vol 69, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey:129-137.
- Nikaido, H. (1982). The Role of Outer Membrane Permeability in the Sensitivity and Resistance of Gram Negative Organisms to Antibiotics. In: Mitsuhashi, S. (ed) *Drug Resistance in Bacteria* : Genetic, Biochemistry, and Molecular Biology. Yapan Scientific Societies Press, Tokyo, Thieme Stratton Inc. New York : 317 - 324.
- Nordheim A, Hashimoto-Gotoh T and Timmis KN. 1980. Location of two relaxation nick sites in R6K and Single sites in pSC101 and RSF1010 close to origins of vegetative replication: Implication for conjugal transfer of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*; 144(3):923-32.
- Normark, S., Edlund, T., Grundstrom, T., bergstrom, S. And Wolf-Watz, H. 1977. *Escherichia coli* K-12 Mutants Hyperproducing Chromosomal Beta-Lactamase by Gene repetition. *J. Bacteriol.*; 132(3): 912-922.
- Nordstrom K, Molin S and Light J. 1984. Control of replication of plasmid: Genetic, Molecular Biology and Physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid*; 12: 71-90.
- Norstrom, K., Burman, LG. And Eriksson-Grenberg, KG. 1970. Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins. VIII. Physiology of Class II Ampicillin resistant Mutant. *J. Bacteriol.*; 101(3):659-668.
- Ogawara, H. (1982). Biochemical mechanism of β -lactam resistance in *Streptomyces*. In: Mitsuhashi, S. (ed). *Drug Resistance in Bacteria* : Genetic, Biochemistry, and Molecular Biology. Yapan Scientific Societies Press, Tokyo, Thieme Stratton Inc. New York :265-268.
- Okamoto, M.P., Nakahiro, R.K., Chin, A., Bedekian, A. and Gill, M.A. 1994. Cefepime: a new fourth generation cephalosporin. *Am. J. Hosp. Pharm.*; 51(4):463-477.
- Ou JT and Anderson TF. 1970. Role of pili in bacterial conjugation. *J. Bacteriol.*; 102(3):648-54.
- Parent, R. and Roy, P.H. 1992. The Chloramphenicol acetyl transferase gene of Tn2424: a new breed of cat. *J. Bacteriol.*; 174(3):2891-2897.
- Pena, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallares, R., Linares, J., Ariza, J. And Gudiol, F. 1998. Epidemiology and Successful Control of Large Outbreak Due to

- Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 42(1): 53-58.
- Praseno. 1994. Hilangnya resistensi Antibiotik Secara spontan pada Beberapa Kuman Gram negatif: Instabilitas Plasmid R. *MKI*; 6(3): 4-6.
- Reynaud, A., Federighi, M., Licois, D., Guillot, J.F. and Joly, B. 1991. R Plasmid in *Escherichia coli* O103 coding for colonization of the rabbit intestinal tract. *Infect. Immun.*;59(6):1888-1892.
- Rice, L.B., Marshall, S.H. and Carias, L.L. 1992. Tn5381, a conjugative transposon identifiable as a circular form in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*;174(22):7308-7315.
- Ringertz, S., Bellete, B., Karlsson, I., Ohman, G., Gedebou, M. and Kronvall, G. 1990. Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* isolates from inpatients with urinary tract infections in hospital in Addis Ababa and Stockholm. *Bull. WHO*; 68(1):61-68.
- Rolinson, G.N. 1991. Evolution of beta lactamase inhibitors. *Surg. Gynaecol. Obstet.*; 172 (Suppl.):11-16.
- Russei, AD. And Chopra, I. 1990. Understanding Antibacterial Action and Resistance. Ellis Horwood Ltd, Singapore.
- Sahm, D.F. and Washington II, J.A. 1991. Antibacterial susceptibility test: Dilution methods. In: Balows A, Hausler Jr WJ, Herrman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds). Manual of Clinical Microbiology, Chapter 110, Fifth Ed. American Society for Microbiology, Washington DC:1105-1116.
- Sambrook, J., Fritsch, E.R. and Maniatis, T. 1989. Extraction and purification of plasmid DNA. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Ed. Cold Spring Harbor Lab.Press, USA:1.21-1.35.
- Senerva, D., Mutanda, L.N., Gathuma, J.M. and Olsvik, O. 1991. Antimicrobial resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from a nosocomial outbreak in Kenya. *APMIS*;99:728-734.
- Sjahrodji, A.M. 1990. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit Department of Child Health, Dr. Hasan Sadikin General Hospital, Bandung. *Paediatrica Indonesiana*;30:191-197.
- Sloan, J., McMurry, L.M., Lyras, D., Levy, S.B. and Rood, J.I. 1994. The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P) which is related to the ribosomal

- protection family of tetracyclin resistance determinant. *Mol. Microbiol.*;11(2):403-415.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1980. Sampel surveys. Statistical Methods, Seventh Ed. Chapter 7 & 21, The Iowa State University Press. Ames, Iowa USA:107-134 & 434-459.
- Soegijanto, S. (1998). Disease and the use of antibiotic pattern in Department of Child Health Dr. Soetomo Hospital Surabaya. *Folia Medica Indonesiana*, Year XXXIV, No. 3: 1-4.
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N. and Poole, K. 1998. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pump MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a Multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 42(1): 65-71.
- Struelens, MJ. 1998. The Epidemiology of Antimicrobial resistance in hospital acquired infection: Problems and Possible Solutions. *BMJ*, 317:652-4.
- Stryer L. 1988. Biochemistry, Third Ed., Chapter 28. WH Freeman and Co., New York: 680-702.
- Subagyo, B., Karim, A. 1985. Pola mikroba hasil isolasi di RSUD Dr. Soetomo. Seminar Infeksi Nosokomial. Surabaya 17 Oktober.
- Surbakti, R. 1990. Hasil sementara survei infeksi nosokomial di 10 rumah sakit pendidikan di Indonesia Tahun 1987. Simposium-Lokakarya Nasional Pengendalian Infeksi Nosokomial.
- Tenover, F.C., LeBlanc, D.J. and Elvrum, P. 1987. Cloning and expression of a tetracyclin resistance determinant from *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agent Chemother.*;31(9):1301-1306.
- Tenover, FC. and Hughes, JM. 1996. The Challenges of Emerging Infectious Diseases. Development and Spread of Multiple-Resistant Bacterial Pathogens. *JAMA*; 275(4): 300-304.
- Tiruneh, M. 1990. Plasmid mediated drug resistance in Enterobacteriaceae at Gondar Hospital. *East Afr. Med. J.*: 260-263.
- Tullus, K., Berglund, B., Fryklund, B., Kuhn, I. and Burman, L.A. 1988. Epidemiology of fecal strains of the Enterobacteriaceae in 22 neonatal wards and influence of antibiotic policy. *J. Clin. Microb.*;26(6): 1166-1170

- Tullus, K., Berglund, B. and Burman, L.G. 1990. Emergence of cross-resistance to beta-lactam antibiotics in fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella* Strains from neonates treated with ampicillin or cefuroxime. *Antimicrob. Agent Chemother.*;34(2):361-362.
- Utji, R. (1998). Antibiotic resistance in Jakarta. *4th Nasional Congress of The Indonesian Society for the Study of Tropical Medicine and Infectious Diseases With Infectious Diseases Society of the Netherlands and Flanders*. Semarang, November 20th-23rd.
- van der Waaij, D. 1990. The Digestive tract as a control endogenous source of bacterial and fungal infections ; The importance of maintaining colonization resistance. Infection in hospitalized patients. *Dutch Foundation For Post Graduate course in Indonesia*, FK-Unair-RSUD Dr. Soetomo November 19-21:31-40.
- van der Waaij, D., de Vries, J.M.B. and van der Wees, J.E.C.L. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J. Hyg. Cam.*;69:405-411.
- Wegener, HC., Aarestrup, FM., Jensen, LB., Hammerun, AM. And Flemming, B. 1999. Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* resistance to Therapeutic Antimicrobial drugs in Europe. *Emerging Infectious Diseases*; 5(3).
- Winans SC and Walker GC 1. 1985. Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* ; 161(1):402-10.
- Woodford, N., Morrison, D., Cookson, B. and George, R.C. 1993. Comparison of high level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* ;37(4):681-684.
- Woodruff WA, Parr Jr TR, Hancock REW, Hanne LF, Nicas TI and Iglewski BH. 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.*;162(2): 473-9.
- Yamaguchi, K. 1995. Clinical experience with a new oral third generation cephalosporin with expanded coverage of *Staphylococcus aureus*. Symposium 'The role of cefdimir (oral cephalosporin) as to day's antibiotic regimen for community acquired infections. Surabaya, 2 September.
- Yan W, Taylor DE. 1991. Characterization of erythromycin resistance in *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 35(10):1989-96.

Yao, J.D.C. and Moellering Jr, R.C. 1991. Antibacterial agents. In: Balows A, Haudeer WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Fifth Ed., Chapter 108, American Society for Microbiology, Washington DC: 1065-1090.

Lampiran 1**Lembar evaluasi dan pendataan penggunaan obat pada penderita di RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya****LEMBAR EVALUASI PENGGUNAAN ANTIMIKROBA RSUD DR SOETOMO SURABAYA**

Lab/RP : Ilmu Kesehatan Jiwa
 Ruang : Nomor Bed:
 Nama :
 Alamat :
 Kelamin : L / W ; Umur : TH.
 Tanggal MRS : 199..
 Diagnosis Utama :
 Diagnosis Ikutan :

TERAPI:

Bulan : 199..

Tgl	Antimikroba dan Dosis	Bukan Antimikroba dan Dosis

Lampiran 2

Tatacara pemeriksaan aglutinasi, biokimiawi dan motilitas *Escherichia coli* (A) Pemisahan plasmid (B), Pembuatan sel kompeten (C), Uji transformasi (D), Uji kepekaan cara difusi cakram (E) dan Pembuatan reagen (F)

A. Tatacara pemeriksaan aglutinasi, biokimiawi dan motilitas *Escherichia coli*

(Baron at al., 1994; Munro, 1992).

1. Uji TSI (*Triple Sugar Iron*)

Uji ini bertujuan menentukan apakah bakteri (*Enterobacteriaceae*) mampu meragi laktosa, sukrosa dan dekstroza, dean atau tanpa menghasilkan gas dan menghasilkan hidrogensulfida (H₂S). Media adalah agar miring (isi media: 0,1% glukosa, 1% laktosa, 1% sukrosa dan sodium tiosulfat) Bakteri ditanam dengan menggunakan sengkelit, diusapkan pada permukaan *Slant* (bagian miring) dan dilanjutkan dengan menusukkan ke dalam *Butt* (bagian dasar). Pengeraman dilakukan suhu 37 °C semalam.

Hasilnya diiihat adanya reaksi berikut ini:

Bagian <i>Slant</i>	apakah ada perubahan warna menjadi kuning (=asam) atau tetap merah
Bagian <i>Butt</i>	a. apakah ada perubahan warna menjadi kuning (=asam) atau tetap merah (=alkali) b. apakah ada produksi gas yang ditandai munculnya bulatan ruang kosong berisi gas (Gas positif atau negatif) c. apakah ada produksi H ₂ S yang ditandai munculnya warna hitam (H ₂ S positif atau negatif).

2. Uji Indol

Uji ini bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut bisa menghasilkan indol.

Uji dilakukan dengan membiakkan bakteri pada media cair triptofan suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian ditambahkan reagen Kovacs 0,5 ml (Reagen Kovac berisi: Iso amil alkohol 150 ml; Para dimetil amino benzaldehid 10 g; asam HCl murni 50 ml). Uji yang positif ditandai terbentuknya cincin warna merah di permukaan media cair.

3. Uji Merah Metil

Bertujuan menentukan apakah bakteri bisa menghasilkan keasaman yang tinggi pada media yang dipakai.

Bakteri dibiakkan pada media MR-VP (media Metil Red-Voges Proskauer = media glukose pepton fosfat yang berisi: pepton 5 g, K₂HPO₄ 5 g, glukose 5 g, larutkan dengan akuadest sampai volume 1 liter), suhu 37 °C selama 2-4 hari. Tambahkan 5 tetes larutan Merah metil. Hasil uji positif ditandai munculnya warna merah pada media. (Reagen Merah metil: 0,1 g Merah metil; 300 ml 95% alkohol dan air suling 500 ml).

4. Uji Voges-Proskauer

Merupakan uji secara tidak langsung terhadap produksi 'Asetil Metil Karbinol'. Bila pada larutan biakan ada asetil metil karbinol, dan ditambah bahan alkali, maka akan terjadi asetil, dimana bahan ini akan bergabung dengan bahan dari pepton dan membentuk warna merah. Bakteri dibiakkan pada 5 ml media MR-VP, dieramkan 37 °C selama 48 jam. Pada 1 ml biakan tambahkan 5 tetes larutan KOH 40%, kemudian tambahkan 15

tetes reagen VP (5% alfa Naftol dalam etil alkohol). Kocok keras dan biarkan selama kira-kira 15 menit. Uji yang positif ditandai terjadinya warna pink.

5. Uji Pemakaian Sitrat

Untuk mengetahui apakah bakteri bisa memakai sitrat sebagai sumber karbon.

Bakteri dibiakkan pada media Simmons Sitrat Simmon (sebagai sumber karbon hanya dipergunakan sitrat), dieramkan suhu 37 °C selama 2-5 hari. Uji yang positif ditandai adanya pertumbuhan bakteri dan merubah indikator(Bromtimol biru) dari hijau menjadi biru gelap.

6. Uji Urease

Untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan enzim Urease yang bisa memecah urea menjadi dua molekul amonia.

Bakteri dibiakkan dalam media cair urea (berisi: Urea 0,1%, KH₂PO₄ 0,2%, NaCl 0,5%, dan ditambah merah fenol 0,5% sebanyak 0,24 ml setiap 100 ml media) dan dieramkan suhu 37 °C semalam. Hasil positif ditandai berubahnya warna media menjadi merah.

7. Uji motilitas

Disediakan 3-4 mililiter media semisolid dalam tabung reaksi. Dengan inokulum menggunakan sengkeli lancip, setelah dicelupkan dalam suspensi bakteri, sengkeli ditusukkan di bagian tengah ke dalam media semisolid. Dieramkan suhu 37 °C semalam. Hasil positif ditandai dengan adanya penyebaran pertumbuhan ke sekitar daerah tusukan

scbagai tanda adanya pertumbuhan dan pergerakan *Escherichia coli* ke sekitar akibat pergerakannya.

8. Uji aglutinasi (dipergunakan cara aglutinasi slide)

Pada permukaan gelas obyek yang bersih, taruh masing-masing satu tetes garam faali, satu untuk test satu untuk kontrol. Pada kedua tetes tersebut, suspensikan satu sengkeliit biakan bakteri yang dicurigai. Selanjutnya pada bagian uji ditambahkan satu tetes antisera polivalen terhadap *Escherichia coli* dan pada bagian kontrol ditambahkan satu tetes garam faali. Gelas obyek digoyang antara 0,5 sampai 2 menit sambil dilihat adanya aglutinasi. Hasil positif ditandai terdapatnya gumpalan-gumpalan pada bagian uji dan tidak ada di bagian kontrol. Pengamatan hasil bisa dilakukan dengan mata telanjang atau menggunakan lensa pembesar. Dipergunakan antisera buatan Biofarma Bandung.

Spesies *Escherichia coli* ditegakkan berdasar hasil berikut ini: TSI (*Slant*: Asam; *Butt*: asam, ada gas, tidak ada H₂S); Indol (positif); MR (positif); VP (negatif); Pemakaian sitrat (negatif); motilitas (positif); produksi urease (negatif) dan aglutinasi (positif). Lihat tabel berikut ini.

Jenis uji	Hasil
1. TSI	Asam ----- Asam, Gas ⁺ , H ₂ S-
2. Indol	+ (positif)
3. MR	+ (positif)
4. VP	- (negatif)
5. Pemakaian Sitrat	- (negatif)
6. Motilitas	+ (positif)
7. Produksi urease	- (negatif)
8. Aglutinasi	+ (positif)

B. Pemisahan plasmid metode alkali (Sambrook *et al.*, 1989)

1. *Escherichia coli* sampel ditanam pada media LB suhu 37 °C semalam pada pengeras bergoyang dengan kecepatan 120 RPM
2. Diambil sebanyak 1,5 mililiter, sel bakteri diendapkan dengan pemusingan 12.000 rpm, suhu 4 °C selama 30 detik.
3. Supernatan dibuang, dan pelet bakteri ditambah 100 µl larutan I dan divorteks keras sampai pelet larut.
4. Tambahkan larutan II sebanyak 200 µl, dilarutkan dengan membaik-balikkan tabung selanjutnya ditaruh dalam air es diamkan beberapa saat.
5. Tambahkan larutan III dingin sebanyak 150 mikroliter, tabung dikocok pelan dengan cara membalik-balikkan tabung. Taruh dalam air es selama 5 menit.
6. Pusingkan kecepatan 12.000 g , suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan yang berisi plasmid yang dicari, dipindah ke tabung baru.
7. Tambahkan etanol absolut sebanyak dua kali volume, campur dengan membalik-balik tabung, biarkan suhu kamar selama 2 menit.
8. Pusingkan kecepatan 12.000 g , suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang.
9. Tambahkan 1 mililiter etanol 70% dingin, pusingkan 12.000 g selama 2 menit.
Supernatan dibuang dan tabung dibiarkan selama 5 menit dengan dalam keadaan tutup terbuka
10. Maka plasmid akan berada pada dasar tabung. Tambahkan larutan TE senyak 50 µl dan disimpan suhu - 20 °C sampai dipergunakan

C. Cara pembuatan sel kompeten

1. Tanam satu koloni biakan semalam pada 50 ml media LB dalam gelas erlenmeyer isi 300 ml; dieramkan suhu 37 °C, 16-20 jam, dengan goyangan ringan (50-60 RPM)
2. Tanam 1 ml dalam 100 ml media LB dalam erlenmeyer isi 500 ml, eramkan suhu 37 °C, dengan goyangan keras (200 RPM). Selama pengeraman kepadatan suspensi biakan diikuti sampai kepadatan pada spektrofotometer OD600 adalah 0,4 sampai 0,5. Pengukuran dilakukan setiap 20 menit dan kemudian setiap 5 menit.
3. Tampung biakan dalam tabung polipropilen isi 50 ml, taruh dalam air es sampai 10 menit.
4. Pusingkan dengan kecepatan 2400 g atau 4000 RPM, suhu 4 °C, selama 10 min.
5. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dengan 10 ml 100 mM CaCl₂ dingin, biarkan dalam air es selama 10 min.
6. Pusingkan dengan kecepatan 2400 g atau 4000 RPM, suhu 4 °C, selama 10 min.
7. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dengan 2.5 ml 100 mM CaCl₂ dingin, biarkan dalam air es selama 2 jam sebelum bisa dipergunakan. Penyimpanan selama 12-24 jam dikatakan bisa meningkatkan efisiensi transformasi.

D. Uji transformasi (Sambrook at al., 1989; Nakata at al., 1997)

1. Dicampur sebanyak 200 µl *Escherichia coli* kompeten dengan 10 µl larutan plasmid sampel.
2. Dicampur dengan memutar-mutar cepat diantara dua telapak tangan ('swirling').
3. Masukkan es selama 30 menit.

4. Masukkan dalam air suhu 42 °C selama 90 detik
5. Masukkan es selama 2 menit.
6. Tambahkan 800 µl media cair Luria Bertani
7. Eramkan suhu 37 °C selama 45 menit, dalam penangas air bergoyang (75 rpm).
8. Dilakukan uji seleksi dengan menanam 100 µl larutan bakteri pada media agar Luria Bertani yang mengandung ampisilin kadar 64 µg per mililiter.
9. Adanya pertumbuhan koloni, menunjukkan adanya perubahan *Escherichia coli* acuan dari peka menjadi kebal, yang berarti ada plasmid kekebalan terhadap ampisilin.

E. Uji kepekaan cara difusi cakram (Munro, 1992)

1. Bakteri dibiakkan pada media agar Mueller Hinton untuk mendapatkan koloni terpisah setelah pengeraman suhu 35 °C semalam.
2. Ambil satu koloni, tanam pada 5 mililiter media cair Mueller Hinton, eramkan suhu 35 °C semalam. Hasil pertumbuhan diencerkan dengan larutan garam faali (NaCl 0,85%) sampai kekeruhan mencapai standard MacFarland 0,5.
3. Lidi kapas steril dicelupkan dalam suspensi bakteri, kurangi kelebihan cairan dengan menekan lidi kapas pada dinding tabung.
4. Hapuskan lidi kapas yang telah mengandung bakteri pada permukaan media agar Mueller Hinton, biarkan suhu kamar selama 5 menit (3 sampai 15 menit).
5. Tempatkan cakram antimikroba pada permukaan agar, sebanyak 5 cakram per lempeng agar.
6. Lempeng agar ditaruh dalam pengeram secara terbalik, dan dieramkan suhu 35 °C semalam.

7. Pembacaan dilakukan berdasar adanya daerah hambatan yang merupakan daerah dengan tidak ada pertumbuhan yang berbentuk lingkaran.
8. Garis tengah lingkaran diukur menggunakan alat pengukur jangka sorong
9. Hasil pengukuran dibandingkan dengan patokan.

F. Pembuatan reagen, bufer dan media pembiakan

1. Susunan larutan TE

10 mM Tris-Cl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

2. Larutan RNase dan cara pembuatan

RNase A	10 mg
Tambahkan pelarut	1 ml
(Tris-Cl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM)	
Dipanaskan 100 °C, 15 menit, kemudian dibiarkan menjadi dingin kembali sampai 60 °C, dan bisa disimpan suhu minus 20 °C	

5. Pembuatan TBE 5X (Bufer Tris-borat EDTA)

Tris base	54 g
Asam Borat	27,50 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,72 g
Akuades	1 liter

6. Loading dye (Sucrose based)

Sucrose	40% (w/v)
Bromophenol blue.	0.25%
H ₂ O	

7. Media Luria Bertani (LB)

H ₂ O deionisasi ('Deionized H ₂ O')	950 ml
Trypton Bacto ('Bacto-tryptone')	10 g
Ekstrak ragi Bacto ('Bacto-Yeast extract')	5 g
NaCl	10 g
Dikocok sampai larut, tambahkan 5 N NaOH (kira-kira 0,2 ml.) sampai pH media menjadi 7. Tambahkan H ₂ O sampai satu liter. Disterilkan pada otoklaf tekanan 15 lb/in ² selama 20 menit.	

8. Pembuatan media MacConkey
- | | | |
|----------------------------------|-------|-------|
| Pepton | 20 | g |
| Laktosa | 10 | g |
| Garam empedu | 5 | g |
| Indikator Neutral red | 0,075 | g |
| Agar | 12 | g |
| Ditambah H ₂ O sampai | 1 | liter |
- pH = 7,4
9. Pembuatan media agar Mueller Hinton
- Dipergunakan media buatan DIFCO dengan susunan berikut ini: Untuk setiap liter media mengandung:
- | | | |
|--------------------------------|------|---|
| Beef, Infusion from | 300 | g |
| Bacto Casaminoacids, Technical | 17.5 | g |
| Starch | 1.5 | g |
| Bacto Agar | 17 | g |
- Cara pembuatan: Ditimbang sebanyak 38 g media bubuk, dilarutkan dalam 1 liter akuades, dicampur dan disteril suhu 121 °C selama 15 menit.
10. Larutan I:
(Lisis alkali)
- | |
|---------------------------|
| 50 mM Glucose |
| 25 mM Tris-Cl, pH 8,0 |
| 10 mM EDTA, pH 8,0 |
| otokiaf, Simpan suhu 4 °C |
11. Larutan II:
(Lisis alkali)
- 0.2 N NaOH (baru dari larutan 10 N)
1 % SDS
- Larutan NaOH 10 N : NaOH 10 N = 400 g/liter; 40 g/100 ml; 40 mg/ml
12. Larutan III:
(Lisis alkali)
- | | | |
|-------------------|------|----|
| 5 M Pot. Acetate | 60 | ml |
| Glacial Ace. Acid | 11.5 | ml |
| H ₂ O | 28.5 | ml |
- (3 M Potasium; 5 M Acetate)

2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	6.00	2.00	.00	8.00
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	4.00	4.00	8.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	4.00	.00	4.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	1.00	1.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	1.00	1.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	9.00	.00	.00	9.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	2.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00	2.00
2.00	3.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	18.00	9.00	27.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	8.00	.00	8.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	35.00	.00	35.00
2.00	4.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	25.60	25.60
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	7.00	.00	7.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	5.00	.00	5.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	5.00	.00	5.00
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	18.00	.00	3.00	21.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	26.00	.00	26.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	8.00	8.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	2.00	.00	2.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	5.00	5.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	7.00	.00	7.00
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	9.00	3.00	.00	12.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	9.00	9.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00
2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	2.00	.00	11.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	1.00	.00	1.00
2.00	4.00	2.00	1.00	2.00	2.00	7.00	.00	1.00	8.00
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	2.00	4.00	6.00
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	8.00	3.00	.00	11.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	2.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	10.00	.00	10.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	8.00	8.00
2.00	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	4.00	.00	.00	4.00
2.00	3.00	2.00	1.00	1.00	2.00	13.00	.00	.00	13.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00	2.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	8.00	8.00
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	3.00	1.00	.00	4.00
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	4.00	6.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	7.00	.00	7.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	2.00	.00	2.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	2.00	2.00	4.00
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	8.00	10.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	9.00	.00	9.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	17.00	.00	17.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	4.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00

2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	16.00	1.00	17.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	3.00	.00	.00	3.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00	2.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00	2.00
2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	3.00	3.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	6.00	6.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	5.00	.00	5.00
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	3.00	.00	4.00
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	2.00	6.00	8.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	1.00	1.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	1.00	.00	1.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	5.00	.00	5.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	8.00	.00	8.00
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	3.00	.00	7.00	10.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	8.00	.00	8.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00	2.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	.00	1.00	3.00
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	2.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	7.00	.00	7.00
2.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.00	.00	.00	.00
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	.00	5.00	.00	5.00
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	.00	.00	.50	.50

Keterangan:

- 1 'Missing' = Angka 9 dan 99 adalah nilai 'MISSING'/data tidak lengkap
- 2 KODE = Kode sampel/RP, 1=RP IKJ, 2=RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya
- 3 JEN_AM = Jumlah jenis antimikroba yang diberikan pada seorang penderita
- 4 AMPI 1=tidak mendapat ampisilin, 2=mendapat ampisilin
- 5 SULB 1=tidak mendapat sulbenisilin; 2= mendapat sulbenisilin
- 6 SEFA 1=tidak mendapat sefalosporin; 2= mendapat sefalosporin
- 7 LAKTAM 1=tidak mendapat antimikroba golongan cincin beta laktam; 2=mendapat antimikroba golongan cincin beta laktam
- 8 AMPI_DOS = dosis total ampisilin (gram) pada seorang penderita
- 9 SULB_DOS = dosis total sulbenisilin (gram) pada seorang penderita
- 10 SEFA_DOS = dosis total sefalosporin (gram) pada seorang penderita
- 11 LAKT_DOS = dosis total antimikroba golongan cincin beta laktam (gram) (termasuk ampisilin, sulbenisilin, sefalosporin dan yang lain) pada seorang penderita
- 12 RP = Ruang Perawatan

Lampiran 4

Perhitungan statistik dengan program komputer SPSS/PC+ terhadap frekuensi dan dosis penggunaan antimikroba di RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

NPAR TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMAL) = AMPI_DOS SULB_DOS SEFA_DOS LAKT_DOS

***** WORKSPACE allows for 10856 cases for NPAR TESTS *****

PROCESS IF (KODE=1).

NPAR TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMAL) = AMPI_DOS SULB_DOS SEFA_DOS LAKT_DOS.

***** WORKSPACE allows for 10856 cases for NPAR TESTS *****

Page 46 SPSS/PC+ 4/15/99

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

AMPI_DOS

Test Distribution - Normal Mean: .3728
Standard Deviation: 1.6877

Cases: 169

Most Extreme Differences				
Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-tailed P
.53415	.53415	-.41259	6.944	.000

Page 47 SPSS/PC+ 4/15/99

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

SULB_DOS

Test Distribution - Normal Mean: .0000
Standard Deviation: .0000

The test distribution has no variance. The test was not run.

Page 48 SPSS/PC+ 4/15/99

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

SEFA_DOS

Test Distribution - Normal Mean: .0000

Standard Deviation: .0000

The test distribution has no variance. The test was not run.

Page 49 SPSS/PC+ 4/15/99

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

LAKT_DOS

Test Distribution - Normal Mean: .5204

Standard Deviation: 2.0310

Cases: 169

Most Extreme Differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-tailed P
51828	.51828	-.39888	6.738	.000

Page 50 SPSS/PC+ 4/15/99

PROCESS IF (KODE=2).

**NPAR TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMAL) = AMPI_DOS SULB_DOS
SEFA_DOS LAKT_DOS.**

***** WORKSPACE allows for 10856 cases for NPAR TESTS *****

Page 51 SPSS/PC+ 4/15/99

----- Koimogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

LAKT_DOS

Test Distribution - Normal Mean: 4.4440
Standard Deviation: 6.0263

Cases: 193

Most Extreme Differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-tailed P
.23043	.19382	-.23043	3.201	.000

This procedure was completed at 12:19:53

**CROSSTAB AMPI SULB SEFA LAKTAM BY KODE/OPTION=3,4/
STATISTIC =1.**

***** Given WORKSPACE allows for 11253 Cells with
2 Dimensions for CROSSTAB problem *****

Page 51 SPSS/PC+ 2/26/99

Crosstabulation: AMPI AMPISILIN
By KODE KODE SAMPEL

KODED>	Count Row Pct Col Pct	KEDOK JIWA 1.00	BEDAH UROL 2.00	Row Total
AMPI				
TIDAK	1.00	160 52.1 94.7	147 47.9 76.2	307 84.8
YA	2.00	9 16.4 5.3	46 83.6 23.8	55 15.2
Column Total		169 46.7	193 53.3	362 100.0

Chi-Square D.F. Significance Min E.F. Cells with E.F.< 5

22.54061 1 .0000 25.677 None
23.95553 1 .0000 (Before Yates Correction)

Number of Missing Observations = 4

Page 52 SPSS/PC+ 2/26/99

Crosstabulation: SULB SULBENISILIN
By KODE KODE SAMPEL

KODED>	Count Row Pct Col Pct	KEDOK JIWA 1.00	BEDAH UROL 2.00	Row Total
SULB				
TIDAK	1.00	169 58.1 100.0	122 41.9 63.2	291 80.4
YA	2.00		71 100.0 36.8	71 19.6
Column Total		169 46.7	193 53.3	362 100.0

Chi-Square D.F. Significance Min E.F. Cells with E.F. < 5

75.02417 1 .0000 33.146 None
77.33985 1 .0000 (Before Yates Correction)

Number of Missing Observations = 4

Page 53 SPSS/PC+ 2/26/99

Crosstabulation: SEFA SEFALOSPORIN
By KODE KODE SAMPEL

KODED>	Count Row Pct Col Pct	KEDOK JIWA 1.00	BEDAH UROL 2.00	Row Total
SEFA				
TIDAK	1.00	169 53.8 100.0	145 46.2 75.1	314 86.7
YA	2.00		48 100.0 24.9	48 13.3
Column Total		169 46.7	193 53.3	362 100.0

Chi-Square D.F. Significance Min E.F. Cells with E.F.< 5

46.31798 1 .0000 22.409 None
 48.45623 1 .0000 (Before Yates Correction)

Number of Missing Observations = 4

Page 54 SPSS/PC+ 2/26/99

Crosstabulation: LAKTAM AM CINCIN B LAKTAM
 By KODE KODE SAMPEL

KODED>	Count Row Pct Col Pct	KEDOK JIWA 1.00	BEDAH UROL 2.00	Row Total
LAKTAM				
TIDAK	1.00	155 75.2 91.7	51 24.8 26.4	206 56.9
YA	2.00	14 9.0 8.3	142 91.0 73.6	156 43.1
Column Total		169 46.7	193 53.3	362 100.0

Chi-Square D.F. Significance Min E.F. Cells with E.F.< 5

153.97667 1 .0000 72.829 None
 156.62778 1 .0000 (Before Yates Correction)

Number of Missing Observations = 4

Page 56 SPSS/PC+ 2/26/99

**NPAR TEST MANN-WHITNEY AMPI_DOS SULB_DOS SEFA_DOS
LAKT_DOS BY KODE (1,2).**

**** WORKSPACE allows for 7678 cases for NPAR TESTS ****

Page 57 SPSS/PC+ 2/26/99

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

AMPI_DOS

by KODE KODE SAMPEL

Mean Rank Cases

164.39 169 KODE = 1.00 KEDOK JIWA

196.48 193 KODE = 2.00 BEDAH UROL

362 Total

Corrected for Ties

U	W	Z	2-tailed P
13416.5	27781.5	-4.6628	.0000

Page 58 SPSS/PC+ 2/26/99

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

SULB_DOS

by KODE KODE SAMPEL

Mean Rank Cases

146.00 169 KODE = 1.00 KEDOK JIWA

212.59 193 KODE = 2.00 BEDAH UROL

362 Total

Corrected for Ties

U	W	Z	2-tailed P
10309.0	24674.0	-8.7146	.0000

Page 59 SPSS/PC+ 2/26/99

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

SEFA_DOS

by KODE KODE SAMPEL

Mean Rank Cases

157.50 169 KODE = 1.00 KEDOK JIWA
202.52 193 KODE = 2.00 BEDAH UROL

362 Total

Corrected for Ties			
U	W	Z	2-tailed P
12252.5	26617.5	-6.9287	.0000

Page 50 SPSS/PC+ 2/26/99

----- Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

LAKT_DOS

by KODE KODE SAMPEL

Mean Rank Cases

119.49 169 KODE = 1.00 KEDOK JIWA
235.80 193 KODE = 2.00 BEDAH UROL

362 Total

Corrected for Ties			
U	W	Z	2-tailed P
5829.0	20194.0	-11.6899	.0000

Page 61 SPSS/PC+ 2/26/99

Lampiran 5

Hasil pemeriksaan uji kepekaan dan uji transformasi *Escherichia coli* isolat dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa dan RP Bedah Urologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya; pene-raan ukuran plasmid pengkode kebal ampisilin dan uji kepekaan sel transforman.

KODECOL	KODERP	KEBALCOL	TRANSFOR	UKURPLA	KEBALTRA
JE1	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE2	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE3	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE4	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE5	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE6	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE7	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE8	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE9	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE10	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE11	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE12	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE13	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE14	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE15	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE16	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE17	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE18	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE19	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE20	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE21	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE22	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE23	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE24	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE25	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE26	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE27	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE28	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE29	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE30	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE31	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE32	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE33	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE34	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE35	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE36	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE37	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE38	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE39	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE40	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE41	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE42	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE43	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE44	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00

JE45	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE46	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE47	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE48	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE49	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE50	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE51	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE52	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE53	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE54	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE55	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00
JE56	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE57	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE58	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE59	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE60	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE61	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE62	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE63	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE64	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE65	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE66	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE67	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE68	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE69	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE70	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE71	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE72	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE73	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE74	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE75	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE76	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE77	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE78	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE79	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE80	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE81	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE82	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE83	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE84	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE85	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE86	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE87	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE88	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE89	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE90	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE91	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE92	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE93	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE94	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE95	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE96	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE97	1.00	1.00	0.00	.00	.00

JE98	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE99	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE100	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE101	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE102	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE103	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE104	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE105	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE106	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE107	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE108	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE109	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE110	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE111	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE112	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE113	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE114	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE115	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE116	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE117	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE118	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE111	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE120	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE121	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE122	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE123	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE124	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE125	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE126	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE127	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE128	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE129	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE130	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE131	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE132	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE133	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00
JE134	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE135	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE136	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE137	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE138	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE139	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE140	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE141	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE142	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE143	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE144	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE145	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE146	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE147	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00
JE148	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE149	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE150	1.00	2.00	1.00	.00	.00

JE151	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE152	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE153	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE154	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE155	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE156	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE157	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE158	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE159	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE160	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE161	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE162	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE163	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE164	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE165	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE166	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE167	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE168	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE169	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE170	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE171	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE172	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE173	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE174	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE175	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE176	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE177	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE178	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE179	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE180	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE181	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE182	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE183	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE184	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE185	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE186	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE187	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE188	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE189	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE190	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE191	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE192	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE193	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE194	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE195	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE196	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE197	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE198	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE199	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE200	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE201	1.00	1.00	.00	.00	.00
JE202	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE203	1.00	2.00	1.00	.00	.00

JE204	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE205	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE206	1.00	2.00	2.00	1.00	3.00
JE207	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE208	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE209	1.00	2.00	1.00	.00	.00
JE210	1.00	2.00	1.00	.00	.00
BE1	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE2	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE3	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE4	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE5	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
BE6	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE7	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE8	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE9	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE10	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
BE11	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE12	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE13	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE14	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00
BE15	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE16	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE17	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE18	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE19	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE20	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE21	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE22	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE23	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE24	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE25	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE26	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE27	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE28	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE29	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE30	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE31	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE32	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE33	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE34	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE35	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE36	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE37	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE38	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE39	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
BE40	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE41	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE42	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE43	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE44	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE45	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE46	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00

BE47	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE48	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE49	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE50	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE51	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE52	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00
BE53	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE54	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE55	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE56	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE57	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00
BE58	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE59	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE60	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE61	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE62	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE63	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE64	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE65	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE66	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE67	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE68	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE69	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE70	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE71	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE72	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE73	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE74	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE75	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE76	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE77	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE78	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE79	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE80	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE81	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE82	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE83	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE84	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE85	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE86	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00
BE87	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE88	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE89	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
BE90	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE91	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE92	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE93	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE94	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE95	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE96	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE97	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE98	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE99	2.00	2.00	1.00	.00	.00

BE100	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE101	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE102	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00
BE103	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE104	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE105	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE106	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE107	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00
BE108	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00
BE109	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE110	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE111	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE112	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE113	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE114	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE115	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00
BE116	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE117	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE118	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE119	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE120	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE121	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE122	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
BE123	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE124	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE125	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE126	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE127	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE128	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE129	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE130	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE131	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE132	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE133	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE134	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE135	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE136	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
BE137	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE138	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE139	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE140	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE141	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE142	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE143	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE144	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE145	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE146	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE147	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE148	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE149	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE150	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE151	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE152	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00

BE153	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE154	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE155	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE156	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE157	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE158	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE159	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE160	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE161	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE162	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE163	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE164	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE165	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE166	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE167	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE168	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE169	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE170	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE171	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE172	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE173	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE174	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE175	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE176	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE177	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE178	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE179	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE180	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE181	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE182	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE183	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE184	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE185	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE186	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE187	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE188	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00
BE189	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE190	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE191	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE192	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE193	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE194	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE195	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE196	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE197	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE198	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE199	2.00	1.00	.00	.00	.00
BE200	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE201	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE202	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE203	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE204	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00
BE205	2.00	2.00	1.00	.00	.00

BE206	2.00	2.00	2.00	1.00	3.00
BE207	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE208	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE209	2.00	2.00	1.00	.00	.00
BE210	2.00	2.00	1.00	.00	.00

Keterangan:

- KODECOL = Kode Escherichia coli; JE = Isolat dari RP Ilmu Kedokteran Jiwa (RP IKJ), BE = Isolat dari RP Bedah Urologi (RP BU)
- KODERP = Kode RP; 1 = RP IKJ, 2 = RP BU
- KEBALCOL TRANSFOR = Kekebalan Escherichia coli terhadap ampisilin; 1 = Peka, 2 = Kebal
- = Hasil transformasi yang menunjukkan adanya plasmid pengkode kebal ampisilin; 1 = negatif, 2 = positif, 0 = Bakteri peka dan tidak ada uji transformasi
- UKURPLA = Kode ukuran plasmid; 1: ≤ 4.361 bp, 2: $>4.361-9.416$ bp, 3: $>9.416-23.130$ bp, 0 = Bakteri peka dan tidak ada uji transformasi
- KEBALTRA = Hasil pemeriksaan Escherichia coli transforman terhadap antimikroba acuan;
- 1 = Kebal terhadap Ampisilin, Eritromisin, Kanamisin, (Sulbenisilin), Trimetoprim
- 2 = Kebal terhadap Ampisilin, Kloramfenikol, (Sulbenisilin), Trimetoprim
- 3 = Kebal terhadap Ampisilin, (Sulbenisilin)
- 0 = Bakteri peka dan tidak ada uji transformasi

Lampiran 6

Perhitungan statistik dengan Program komputer SPSS/PC+ terhadap isolat *Escherichia coli* dari RP IKJ dan RP BU RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Parameter yang diuji adalah:

KEBALCOL : Hasil uji kepekaan *Escherichia coli* sampei
 TRANSFOR : Hasil uji transformasi
 KEBALTRA: Hasil uji kepekaan bakteri transforman
 KODEPLA : Ukuran plasmid dalam skala ordinal

CROSSTABULATION KEBALCOL TRANSFOR KEBALTRA BY KODERP/OPTION 3,4/STATISTIC=1.

***** Given WORKSPACE allows for 11390 Cells with
 2 Dimensions for CROSSTAB problem *****

Page 3

SPSS/PC+

7/2/99

**Crosstabulation: KEBALCOL KEKEBALAN E COLI SAMPEL
 By KODERP KODE LOKASI/RP**

KODERP	Count	KED JIWA	BEDAH UR	Row Total
	Row Pct	1.00	2.00	Total
KEBALCOL	Col Pct			
PEKA	1.00	39	36	75
		52.0	48.0	17.9
		18.6	17.1	
KEBAL	2.00	171	174	345
		49.6	50.4	82.1
		81.4	82.9	
Column Total		210	210	420
Total		50.0	50.0	100.0

Chi-Square D.F. Significance Min E.F. Cells with E.F.< 5

.06493 1 .7989 37.500 None
 .14609 1 .7023 (Before Yates Correction)

Number of Missing Observations = 0

Page 4

SPSS/PC+

7/2/99

Crosstabulation: TRANSFOR HASIL TRANSFORMASI
By KODERP KODE LOKASI/RP

KODERP	Count	KED JIWA	BEDAH UR	Row Total
	Row Pct	1.00	2.00	
TRANSFOR	Col Pct			
NEGATIF	1.00	143	116	259
		55.2	44.8	75.1
		83.6	66.7	
POSITIF	2.00	28	58	86
		32.6	67.4	24.9
		16.4	33.3	
Column Total		171	174	345
		49.6	50.4	100.0

Chi-Square	D.F.	Significance	Min E.F.	Cells with E.F. < 5
12.36396	1	.0004	42.626	None
13.25470	1	.0003	(Before Yates Correction)	

Number of Missing Observations = 75

Page 5

SPSS/PC+

7/2/99

Crosstabulation: KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN
By KODERP KODE LOKASI/RP

KODERP	Count	KED JIWA	BEDAH UR	Row Total
	Row Pct	1.00	2.00	
KEBALTRA	Col Pct			
Am,Eri,Ka,Sul,Tr	1.00		4	4
			100.0	4.7
Am,Klo,Sul,Tri	2.00	3	6	9
		33.3	66.7	10.5
		10.7	10.3	
Am,Sul	3.00	25	48	73
		34.2	65.8	84.9
		89.3	82.8	
Column Total		28	58	86
Total		32.6	67.4	100.0

PROCESS IF (KODERP=1).**FREQUENCY KEBALCOL TRANSFOR KEBALTRA KODEPLA.**

***** Memory allows a total of 15532 Values, accumulated across all Variables.

There also may be up to 1941 Value Labels for each Variable.

Page 10 SPSS/PC+ 7/2/99

KEBALCOL KEKEBALAN E COLI SAMPEL

Value Label	Value	Valid Cum			
		Frequency	Percent	Percent	Percent
PEKA	1.00	39	18.6	18.6	18.6
KEBAL	2.00	171	81.4	81.4	100.0
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 210 Missing Cases 0

Page 11 SPSS/PC+ 7/2/99

TRANSFOR HASIL TRANSFORMASI

Value Label	Value	Valid Cum			
		Frequency	Percent	Percent	Percent
NEGATIF	1.00	143	68.1	83.6	83.6
POSITIF	2.00	28	13.3	16.4	100.0
	.00	39	18.6	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 171 Missing Cases 39

Page 12 SPSS/PC+ 7/2/99

KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN

Value Label	Value	Valid Cum			
		Frequency	Percent	Percent	Percent
Am,Klo,Sul,Tri	2.00	3	1.4	10.7	10.7
Am,Sul	3.00	25	11.9	89.3	100.0
	.00	182	86.7	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 28 Missing Cases 182

Page 13 SPSS/PC+ 7/2/99

KODEPLA KODE UKURAN PLASMID

Value Label	Value	Valid		Cum	
		Frequency	Percent	Percent	Percent
=<4.361 BP	1.00	28	13.3	100.0	100.0
	.00	182	86.7	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 28 Missing Cases 182

Page 14 SPSS/PC+ 7/2/99

This procedure was completed at 13:02:50

PROCESS IF (KODERP=2).

FREQUENCY KEBALCOL TRANSFOR KEBALTRA KODEPLA.

***** Memory allows a total of 15532 Values, accumulated across all Variables.
There also may be up to 1941 Value Labels for each Variable.

Page 15 SPSS/PC+ 7/2/99

KEBALCOL KEKEBALAN E COLI SAMPEL

Value Label	Value	Valid		Cum	
		Frequency	Percent	Percent	Percent
PEKA	1.00	36	17.1	17.1	17.1
KEBAL	2.00	174	82.9	82.9	100.0
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 210 Missing Cases 0

Page 16 SPSS/PC+ 7/2/99

TRANSFOR HASIL TRANSFORMASI

Value Label	Value	Valid		Cum	
		Frequency	Percent	Percent	Percent
NEGATIF	1.00	116	55.2	66.7	66.7
POSITIF	2.00	58	27.6	33.3	100.0
	.00	36	17.1	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 174 Missing Cases 36

Page 17 SPSS/PC+ 7/2/99

KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN

Value Label	Value	Valid		Cum	
		Frequency	Percent	Percent	Percent
Am,Eri,Ka,Sul,Tri	1.00	4	1.9	6.9	6.9
Am,Klo,Sul,Tri	2.00	6	2.9	10.3	17.2
Am,Sul	3.00	48	22.9	82.8	100.0
	.00	152	72.4	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 58 Missing Cases 152

Page 18 SPSS/PC+ 7/2/99

KODEPLA KODE UKURAN PLASMID

Value Label	Value	Valid		Cum	
		Frequency	Percent	Percent	Percent
=<4.361 BP	1.00	38	18.1	65.5	65.5
>4.361-9.416 BP	2.00	10	4.8	17.2	82.8
>9.416-23.130 BP	3.00	10	4.8	17.2	100.0
	.00	152	72.4	MISSING	
TOTAL		210	100.0	100.0	

Valid Cases 58 Missing Cases 152

Page 19

SPSS/PC+

7/2/99

This procedure was completed at 13:02:54

RECODE KEBALTRA (1=4)(2=3)(3=1).

PROCESS IF (TRANSFOR=2).

LIST VARIABLE KODECOL KODERP KODEPLA KEBALTRA.

The raw data or transformation pass is proceeding

420 cases are written to the uncompressed active file.

Page 20

SPSS/PC+

7/2/99

KODECOL	KODERP	KODEPLA	KEBALTRA
JE1	1.00	1.00	1.00
JE6	1.00	1.00	1.00
JE15	1.00	1.00	1.00
JE17	1.00	1.00	1.00
JE20	1.00	1.00	1.00
JE26	1.00	1.00	1.00
JE29	1.00	1.00	1.00
JE34	1.00	1.00	1.00
JE44	1.00	1.00	1.00
JE55	1.00	1.00	3.00
JE61	1.00	1.00	1.00
JE68	1.00	1.00	1.00
JE77	1.00	1.00	1.00
JE86	1.00	1.00	1.00
JE100	1.00	1.00	1.00
JE106	1.00	1.00	1.00
JE114	1.00	1.00	1.00
JE122	1.00	1.00	1.00
JE129	1.00	1.00	1.00
JE133	1.00	1.00	3.00
JE140	1.00	1.00	1.00
JE147	1.00	1.00	3.00
JE158	1.00	1.00	1.00
JE168	1.00	1.00	1.00
JE185	1.00	1.00	1.00
JE191	1.00	1.00	1.00
JE196	1.00	1.00	1.00
JE206	1.00	1.00	1.00

BE5	2.00	1.00	3.00
BE6	2.00	3.00	1.00
BE10	2.00	1.00	3.00
BE14	2.00	2.00	4.00
BE16	2.00	1.00	1.00
BE18	2.00	3.00	1.00
BE22	2.00	3.00	1.00
BE27	2.00	3.00	1.00
BE28	2.00	1.00	1.00
BE31	2.00	1.00	1.00
BE32	2.00	1.00	1.00
BE33	2.00	1.00	1.00
BE39	2.00	1.00	3.00
BE40	2.00	1.00	1.00
BE46	2.00	1.00	1.00
BE50	2.00	1.00	1.00
BE52	2.00	2.00	1.00
BE55	2.00	3.00	1.00
BE57	2.00	2.00	1.00
BE61	2.00	1.00	1.00
BE63	2.00	1.00	1.00
BE66	2.00	1.00	1.00
BE68	2.00	1.00	1.00
BE69	2.00	1.00	1.00
BE72	2.00	1.00	1.00
BE73	2.00	1.00	1.00
BE77	2.00	1.00	1.00
BE80	2.00	1.00	1.00
BE82	2.00	1.00	1.00
BE86	2.00	4.00	4.00
BE89	2.00	3.00	3.00
BE90	2.00	1.00	1.00
BE95	2.00	1.00	1.00
BE98	2.00	1.00	1.00
BE102	2.00	1.00	1.00
BE107	2.00	2.00	1.00
BE108	2.00	2.00	4.00
BE115	2.00	2.00	1.00
BE122	2.00	2.00	3.00
BE125	2.00	1.00	1.00
BE131	2.00	1.00	1.00
BE133	2.00	1.00	1.00
BE136	2.00	1.00	3.00
BE141	2.00	1.00	1.00
BE143	2.00	1.00	1.00

BE152	2.00	1.00	1.00
BE155	2.00	1.00	1.00
BE161	2.00	1.00	1.00
BE166	2.00	1.00	1.00
BE169	2.00	3.00	1.00
BE176	2.00	1.00	1.00
BE183	2.00	1.00	1.00
BE188	2.00	2.00	4.00
BE193	2.00	3.00	1.00
BE198	2.00	1.00	1.00
BE200	2.00	1.00	1.00
BE204	2.00	3.00	1.00
BE206	2.00	1.00	1.00

Number of cases read = 86 Number of cases listed = 86

Page 25 SPSS/PC+ 7/2/99

This procedure was completed at 13:02:57

PROCESS IF (KODERP=1).

NPAR TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMAL) = KEBALTRA.

***** WORKSPACE allows for 18762 cases for NPAR TESTS *****

Page 26 SPSS/PC+ 7/2/99

----- Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN

Test Distribution - Normal Mean: 1.2143

Standard Deviation: .6299

Cases: 28

Most Extreme Differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-tailed P
.52599	.52599	-.36686	2.783	.000

Page 27 SPSS/PC+ 7/2/99

This procedure was completed at 13:02:58

PROCESS IF (KODERP=2).**NPAR TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMAL) = KEBALTRA.**

***** WORKSPACE allows for 18762 cases for NPAR TESTS *****

Page 28 SPSS/PC+ 7/2/99

- - - - Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN

Test Distribution - Normal Mean: 1.4138

Standard Deviation: .9372

Cases: 58

Most Extreme Differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-tailed P
.49816	.49816	-.32942	3.794	.000

Page 29 SPSS/PC+ 7/2/99**PROCESS IF (TRANSFOR=2).****NPAR TEST MANN-WHITNEY KEBALTRA BY KODERP (1,2).**

***** WORKSPACE allows for 10998 cases for NPAR TESTS *****

Page 30 SPSS/PC+ 7/2/99

- - - - Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test

KEBALTRA KEKEBALAN SEL TRANSFORMAN
by KODERP KODE LOKASI/RP

Mean Rank	Cases
41.39	28 KODERP = 1.00 KED JIWA
44.52	58 KODERP = 2.00 BEDAH UROL

--
86 Total

Corrected for Ties			
U	W	Z	2-tailed P
753.0	1159.0	-.8738	.3822

Page 31 SPSS/PC+ 7/2/99

This procedure was completed at 13:03:00

**PROCESS IF (TRANSFOR=2).
CORRELATION KODEPLA KEBALTRA.**

Page 32 SPSS/PC+ 7/2/99

Correlations: KODEPLA KEBALTRA

KODEPLA	1.0000	.0717
KEBALTRA	.0717	1.0000

N of cases: 86 1-tailed Signif. * - .01 ** - .001

". " is printed if a coefficient cannot be computed

Page 33 SPSS/PC+ 7/2/99

This procedure was completed at 13:03:01

Keterangan KODERP = Kode Ruang Perawatan (Lokasi Penelitian);
1 = RP IKJ, 2 = RP BU