

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 $40\% \times 87,95 \text{ gram} \times 1/107 = 0,329 \text{ gram}$.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

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.

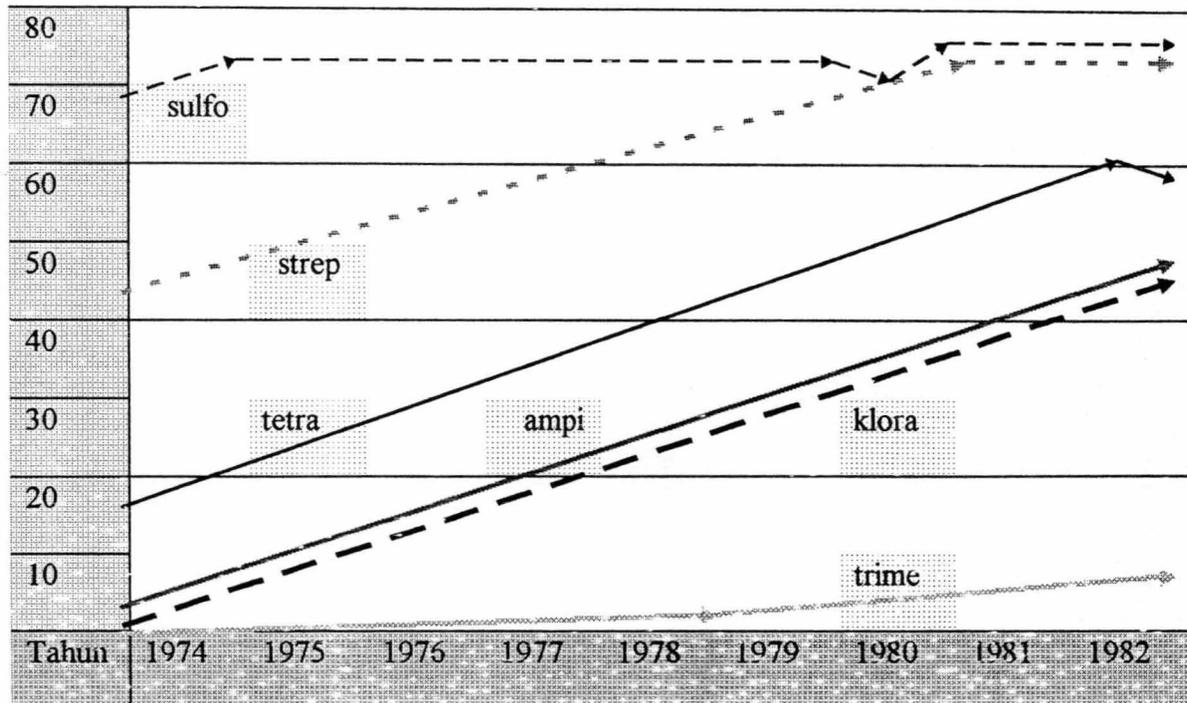
Tingginya angka kejadian plasmid pengkode kebal ampisilin di RP BU, dapat terjadi karena peningkatan ekspresi plasmid yang disertai dengan peningkatan kadar plasmid dalam sel bakteri. Hal ini mengakibatkan plasmid mudah berpindah ke bakteri sekitar, disamping tingginya kadar plasmid tersebut mengakibatkan 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.

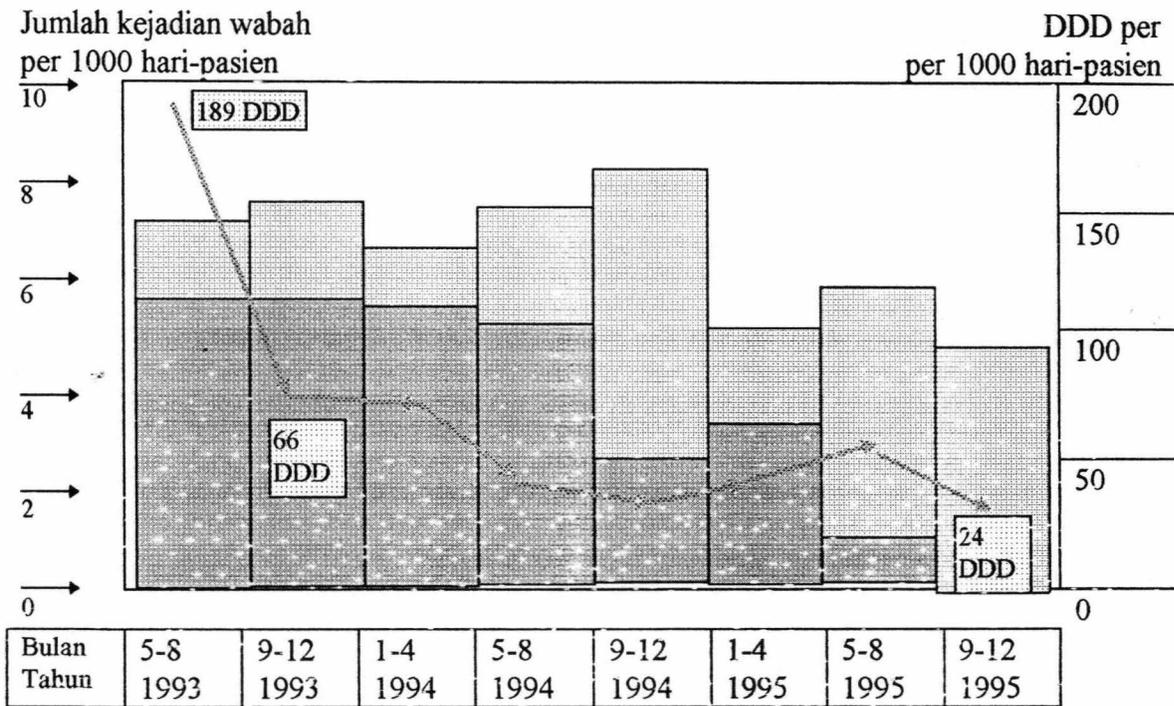
Keterangan: sulfo = sulfonamid; strep = streptomisin; tetra = tetrasiklin; ampi = ampisilin; trime = trimetoprim

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 anuimikroba 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. Kotrimoksasol	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 *ampC* 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 resistance') pada bakteri, tidak terkait dengan tinggi atau rendahnya tingkat penggunaan antimikroba, namun disebabkan oleh hal lain yang masih perlu dicari penyebabnya.