

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 transglikosilase, 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 sefamandol (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

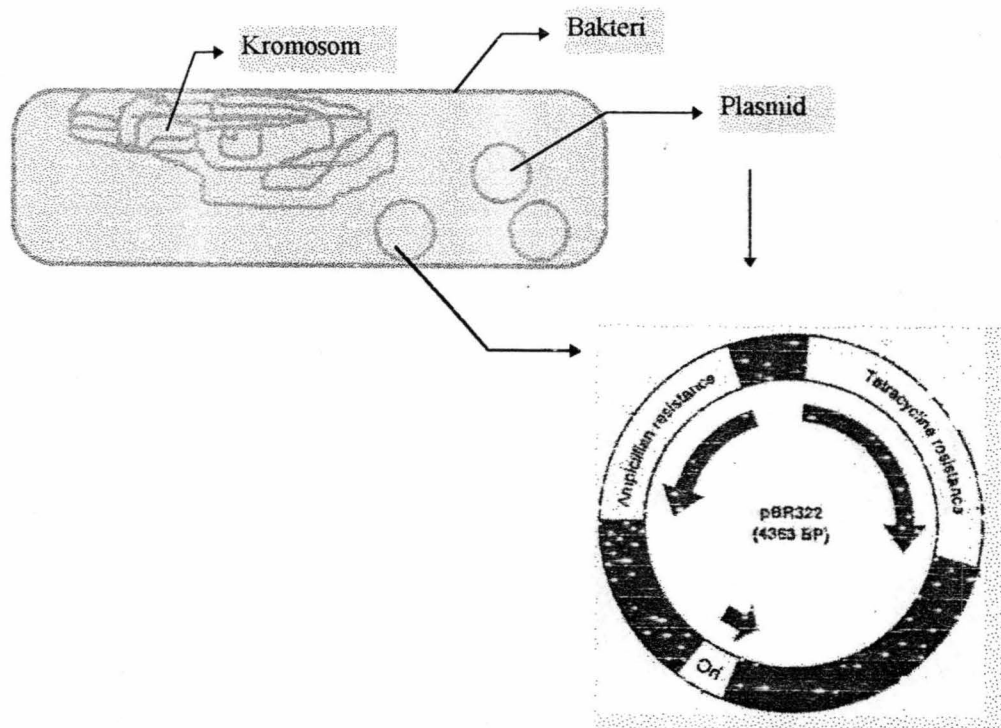
2.2.1 Plasmid pengkode kekebalan

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 tranferase 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).

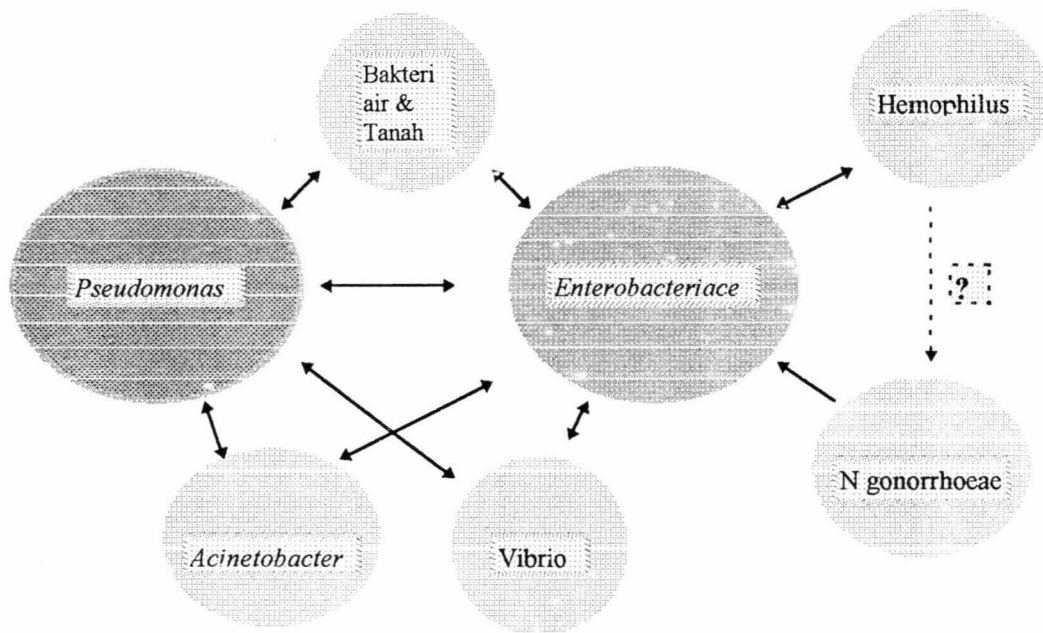
Pada penelaahan plasmid penentu enzim CTX-1 beta laktamase ('CTX = Cefotaximase'), ternyata sudah terjadi penyebaran diantara 23 strain bakteri yang meliputi 6 spesies yakni *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus morgani* dan *Serratia 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)

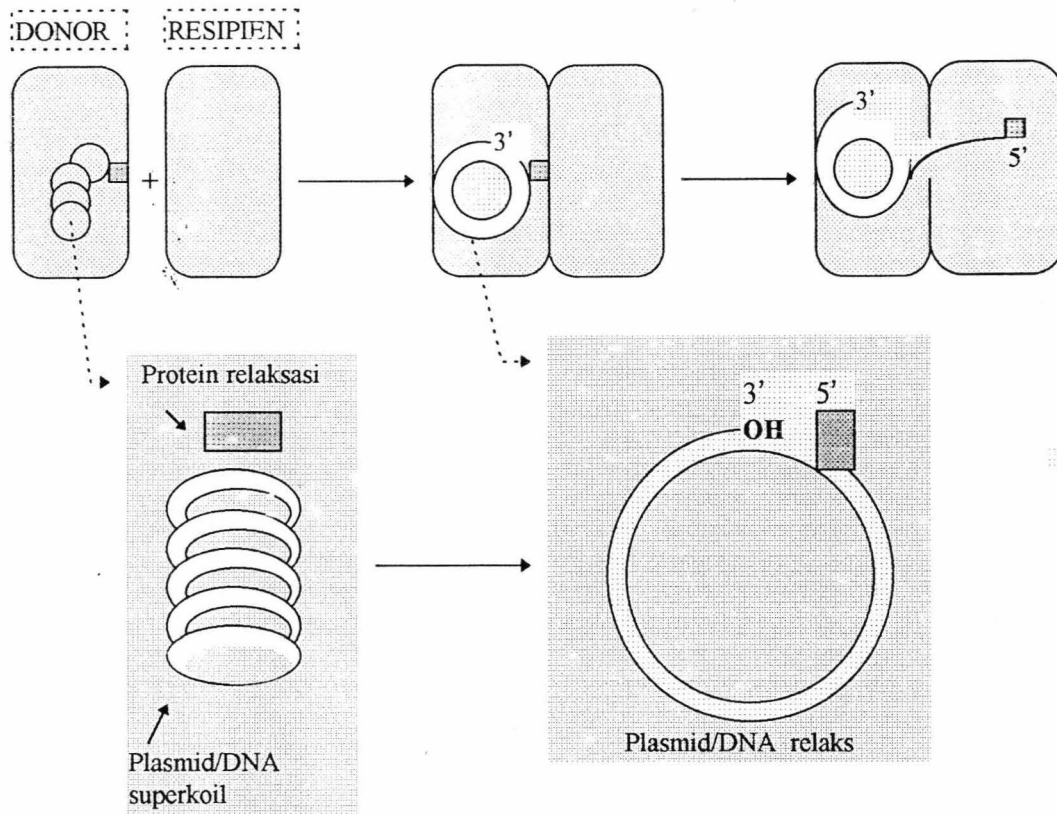


Gambar 2.2

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
 [shaded rectangle] atau [small square] = 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.

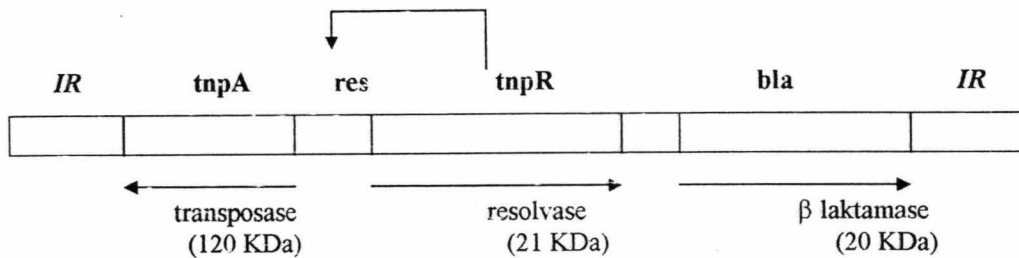
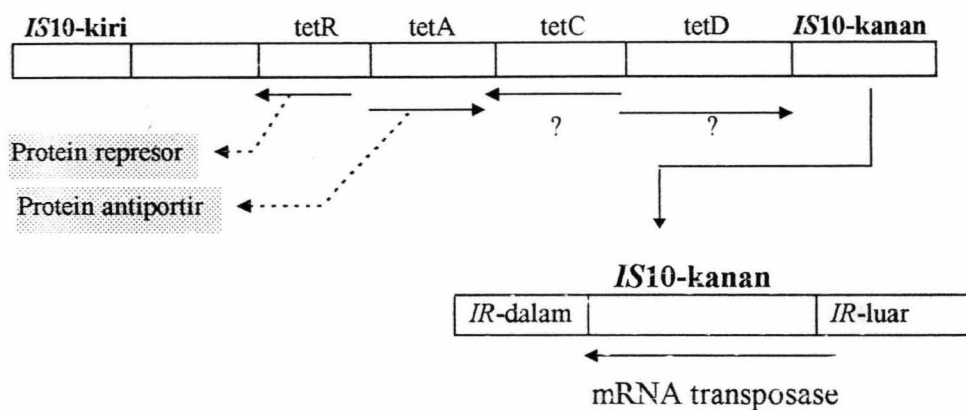
Tn3 mengandung gen *tnpA* yang mengkode enzim transposase dengan berat 120 KDa; *tnpR* mengkode protein represor dengan berat 21 KDa; dan gen *bla* yang mengkode enzim beta laktamase dengan berat 20 KDa. Protein represor ini dapat mengikat promoter pada titik *res* ('*Cointegrate resolution site*') sehingga 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.

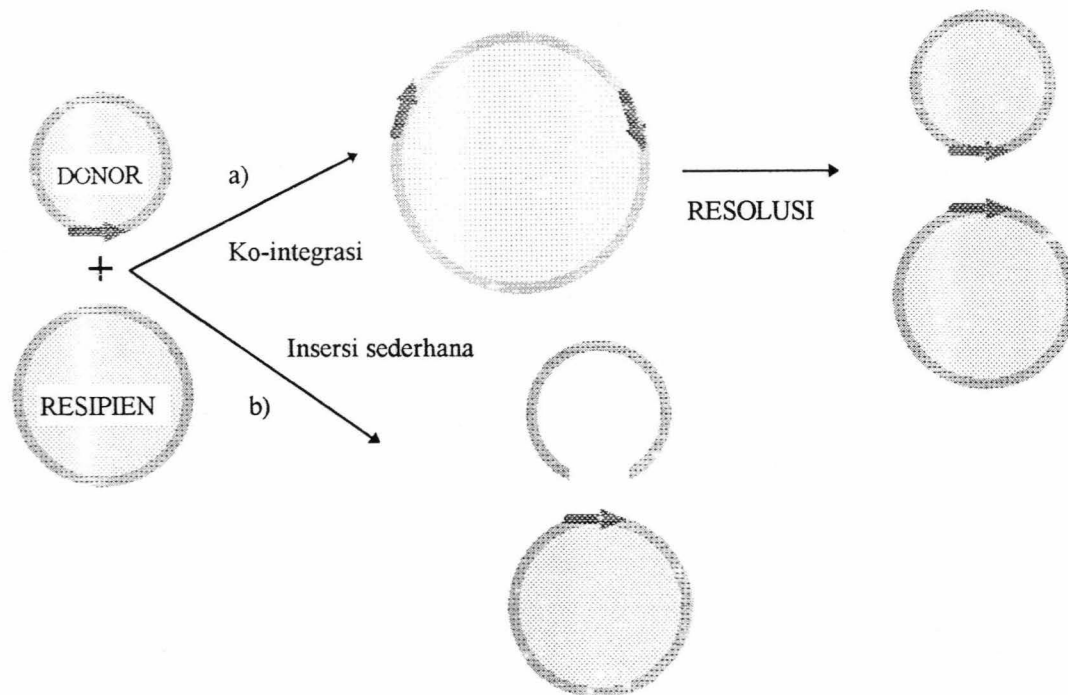
A: *Tn3* dalam plasmid *RI***B: *Tn10* dalam plasmid 222 (disebut juga plasmid *NR1*)****Gambar 2.4**

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

Keterangan:

tnpA=gen transposase; *tnpR*=gen represor; *res*='*Cointegrade 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 sefiksim, 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 morganii* 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.