

Kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam Identifikasi ESBL Tipe SHV dan CTX-M dari Isolat *Enterobacteriaceae* Penghasil ESBL

The Aggrement Between of Vitek2 and Hybrispot24 in Identification of SHV-Type ESBLs and CTX-M-Type ESBLs from ESBL Producing *Enterobacteriaceae* Isolat



TESIS

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian dari Persyaratan Mendapatkan Gelar Keahlian di Bidang Mikrobiologi Klinik

**Diajukan Oleh :
JIHAN SAMIRA**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS – 1
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG**

2019

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam Identifikasi ESBL Tipe SHV dan CTX-M dari Isolat *Enterobacteriaceae* Penghasil ESBL

Disusun oleh :

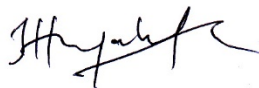
Jihan Samira

22200116320005

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 26 September 2019

Menyetujui,

Pembimbing I



Dr. Mujahidah, Sp.MK
NIP. 197811282006042008

Pembimbing II



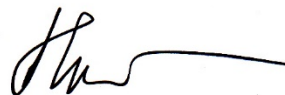
dr. Helmia Farida, M.Sc, Sp.A, PhD
NIP. 196612132001122001

Penguji Ketua



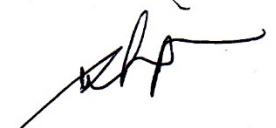
Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina
DMM, M.Kes
NIP. 195905271986032001

Penguji Anggota



Prof. Dr.dr.Hendro Wahjono,
Msc.TropMed,DMM, Sp.MK(K)
NIP.194805071979011001

Penguji Anggota



dr. Rebriarina Hapsari
Msc, Sp.MK
NIP 198310012008122005

Mengetahui,

Ketua Program Studi Mikrobiologi Klinik FK UNDIP



dr. Rebriarina Hapsari, M.Sc, Sp.MK

NIP 198310012008122005

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta terdapat unsur – unsur yang tergolong plagiarism sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas no. 17 tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan manapun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pusaka.

Peneliti, Semarang 2019

Jihan Samira

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr.Jihan Samira
Jenis Kelamin : Perempuan
Tempat/ tanggal lahir : Tasikmalaya/ 04 Desember 1976
Agama : Islam
Alamat : Jl. Solo no 11 Semarang

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri 05 Tamansari : Lulus tahun 1989
2. SMP Negeri 5 Jakarta Barat : Lulus tahun 1992
3. SMA Negeri 68 Salemba : Lulus tahun 1995
4. FK Trisakti : Lulus tahun 2002
5. PPDS Mikrobiologi Klinik FK UNDIP

C. Riwayat Pekerjaan

Tahun 2003-Sekarang : Staf Pengajar FK USAKTI

D. Riwayat Keluarga

Nama orang tua
Ayah : Tabit Abri (Alm)
Ibu : Latifah
Nama Suami : Salim Riyad, SH, M.H
Nama Anak : Belva Zara Allea
Sahira Yumna Ayla

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT, karena atas segala kemurahan dan kasih sayangnya telah mengantarkan kami menyelesaikan tesis yang berjudul “Kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam Identifikasi ESBL Tipe SHV dan CTX-M dari Isolat Enterobacteriaceae Penghasil ESBL”. Tesis ini ditulis untuk memenuhi persyaratan menyelesaikan pendidikan dan mendapatkan gelar Spesialis Mikrobiologi Klinik pada Program Pendidikan Dokter Spesialis I Mikrobiologi Klinik di Fakultas Kedokteran Univ.Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi

Ucapan terimakasih disampaikan dengan hormat kepada :

1. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk menempuh program pendidikan spesialisasi.
2. Direktur RSUP Dr. Kariadi beserta seluruh jajarannya yang telah memberikan kesempatan dan kerjasama yang baik selama saya menempuh pendidikan.
3. Dr. Endang Lestari, Ph.D selaku Ketua Bagian Mikrobiologi Klinik FK UNDIP atas bimbingan selama menempuh pendidikan
4. dr. Rebriarina Hapsari, M.Sc, SpMK selaku Ketua Program Studi Mikrobiologi Klinik FK Undip atas bimbingan selama menempuh pendidikan
5. Prof. DR. dr. Hendro Wahjono, DMM, Msc.TropMed, SpMK(K) guru saya yang telah memberikan bimbingannya selama menjalani pendidikan.
6. Prof. DR. dr. Winarto, DMM, SpMK, SpM(K) guru saya yang penuh kesabaran membimbing saya selama menempuh pendidikan.
7. Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM,M.Kes, guru saya yang telah memberikan bimbingannya selama menjalani pendidikan.

8. dr. Mujahidah, Sp. MK guru saya dan selaku pembimbing pertama yang telah membimbing saya menyelesaikan tesis pada waktunya
9. dr. Helmia Farida. M.Kes, Sp.A, PhD guru saya dan selaku pembimbing kedua yang telah membimbing saya menyelesaikan tesis pada waktunya
10. dr. V. Rizke Ciptaningtyas, M.Si.Med, Sp.MK (K), guru saya yang telah membimbing saya selama menempuh pendidikan
11. dr. Iva Puspitasari, SpMK selaku kepala SMF Mikrobiologi Klinik RSUP dr. Kariadi atas dukungan dan bimbingannya selama menempuh pendidikan.
12. dr. Bambang Isbandrio, Sp.MK(K) (Alm), guru saya yang dengan penuh kesabaran membimbing saya.
13. dr. Subakir, Sp.MK(K), SpKK(K), guru saya di bagian Mikrobiologi Klinik yang selalu mencurahkan perhatiannya kepada anak didik, memberikan bimbingan dan dorongan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan dengan baik.
14. dr. Musrichan, PMK, Sp.PD, guru saya di bagian Mikrobiologi Klinik FK Undip atas nasehat dan pencerahannya.
15. dr. Desvita Sari, Sp.MK, guru saya yang telah membimbing saya selama menempuh pendidikan.
16. Dr. dr. Budiman Bela, Sp.MK, yang telah bermurah hati mengijinkan pelaksanaan penelitian ini di Laboratorium Mikrobiologi RS.UI Jakarta.
17. Ir. Hamsi, Pak Yosep Sugiarto dan Pak Michael Arianto dari PT. Graha megatama Indonesia yang telah mensupport alat Hybrispot24, bahan habis pakai dan tenaga ahli dalam pelaksanaan penelitian ini.
18. Ayah Tabit Abri (Alm), Ibunda Latifah, Ayah Mertua Ali Idrus BSA, Ibu Mertua Ghozalah tercinta yang selalu mendoakan dan mendukung serta memberikan restu untuk meraih cita- cita.

19. Suamiku tercinta, Salim Riyad, SH, M.H dan anak-anak tersayang Belva Zara Allea dan Sahira Yumna Ayla atas segala doa, cinta dan dukungannya yang luar biasa memberikan semangat dalam menempuh pendidikan.
 20. Adikku dr. Amir Reza, dan dr. Nadine Shakinah, M.Kes, Sp.A atas segala doa dan dukungannya yang luar biasa memberikan semangat dalam menempuh pendidikan.
 21. Teman-teman PPDS Mikrobiologi Klinik yang tercinta atas segala dalam menempuh pendidikan ini.
 22. dr. Sry Rezeki, yang telah banyak membantu dan menjadi bagian keluarga selama saya menempuh pendidikan ini.
 23. Seluruh staf Mikrobiologi Klinik baik di FK Undip maupun di RSUP Dr. Kariadi atas segala bantuan dan kerjasamanya sehingga saya dapat
- Akhirnya saya berharap semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada semua pihak yang telah membantu saya selama masa pendidikan dan menyelesaikan tesis ini. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi pelayanan kesehatan dan pendidikan di Indonesia.

Semarang, September 2019

Jihan Samira

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
LEMBAR MONITORING PERBAIKAN SEMINAR HASIL TESIS	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan Penelitian	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat untuk pengetahuan	6
1.4.2 Manfaat untuk masyarakat	6
1.4.3 Manfaat untuk penelitian	6
1.5 Orisinalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Antibiotik <i>Beta-lactam</i>	9
2.2 <i>Beta-lactamase</i> dan <i>Beta-lactamase</i> Spektrum Luas (<i>Extended Spectrum</i> <i>Beta-lactamase/ ESBL</i>)	11
2.2.1 Klasifikasi <i>Beta-lactamase</i>	12
2.2.2 Klasifikasi Ambler	12
2.2.3 Klasifikasi Bush-Jacoby Medeiros	16
2.3 Epidemiologi ESBL	18

2.4 Jenis <i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> (ESBL)	21
2.5 Pemeriksaan Laboratorium Jenis <i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> (ESBL)	24
2.5.1 Skrining dengan menggunakan metode.....	24
2.5.2 Tes konfirmasi fenotipe untuk produksi ESBL	24
2.6 Hybrispot24.....	33
2.7 Kerangka Teori.....	38
2.8 Kerangka Konsep	39
2.9 Hipotesis.....	39
BAB III METODE PENELITIAN.....	40
3.1 Ruang Lingkup Penelitian	40
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	40
3.2.1 Tempat Penelitian	40
3.2.2 Waktu Penelitian.....	40
3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	40
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian.....	40
3.4.1 Populasi Penelitian.....	40
3.4.2 Sampel Penelitian	40
3.5 Variabel Penelitian	42
3.6 Definisi Operasional	42
3.7 Alat dan Bahan	43
3.7.1 Alat	43
3.7.2 Bahan	44
3.8 Alur Penelitian.....	45
3.9 Etika Penelitian.....	45
3.10 Analisis Data.....	45
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	47
4.1 Deteksi Tipe ESBL oleh Vitek2.....	48
4.2 Deteksi tipe ESBL oleh Hybrispot24.....	49
BAB V PEMBAHASAN	52
5.1 Karakteristik Tipe ESBL dan Gen Penghasil Enzim ESBL di RSUP Dr. Kariadi Semarang	52

5.2 Kesesuaian antara Vitek2 dan Hubrispot24 dalam Mendeteksi Gen ESBL SHV dan CTX-M.....	56
5.3 Implikasi Penelitian.....	56
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	61
6.1 Simpulan.....	61
6.2 Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Orisinalitas penelitian	6
Tabel 2. Klasifikasi Ambler.....	13
Tabel 3. Klasifikasi <i>beta-lactamase</i> berdasarkan Bush-Jacoby Medeiros	16
Tabel 4.1 Distribusi Sampel dan Spesies Bakteri dan Tipe ESBL Berdasarkan Vitek2	48
Tabel 4.2 Distribusi Sampel dan Spesies Bakteri dan Tipe ESBL Berdasarkan Hybrispot24	49
Tabel 4.3 Perbandingan Deteksi ESBL Tipe CTX-M dan SHV oleh Vitek2 dan Hybrispot24	50
Tabel 4.4 Hasil Uji Kappa ESBL Deteksi Tipe SHV oleh Vitek2 dan Gen SHV dari Hybrispot24	51
Tabel 4.5 Hasil Uji Kappa Deteksi ESBL tipe CTC-M SHV dari Vitek2 dan blaCTX-M oleh Hybrispot24.....	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme resistensi penisilin	9
Gambar 2. Mekanisme resistensi bakteri Gram negatif terhadap beberapa antibiotika	10

DAFTAR SINGKATAN

AMRIN	: <i>Antimicrobial Resistance in Indonesia: prevalence and prevention</i>
CDC	: <i>Center or Disease Control and Prevention</i>
CLSI	: <i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX-M	: <i>Cefotaxim Munich</i>
ESBL	: <i>Extended-Spectrum beta-lactamase</i>
KPC	: <i>Klebsiella Producing Carbapenemases</i>
NDM	: <i>New Delhi Metalo Beta Lactamase</i>
NNIS	: <i>National Nosocomial Infection Surveillance</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SHV	: <i>Sulfhydryl variable</i>
TEM	: <i>Temoneira</i>

ABSTRAK

Latar belakang

Identifikasi tipe enzim *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) dapat dilakukan secara fenotipik dan genotipik. Vitek2 (fenotipik) dapat mengidentifikasi beberapa tipe ESBL, termasuk CTX-M dan SHV. Hybrispot24 (genotipik) dapat mengidentifikasi gen penyandi-ESBL tipe CTX-M (*bla*CTX-M) dan SHV (*bla*SHV). RSUP Dr. Kariadi memiliki prevalensi infeksi oleh *Enterobacteriaceae* penghasil-ESBL tinggi, tetapi belum memiliki data karakteristik/tipe ESBL dari pathogen tersebut.

Tujuan

Mengidentifikasi karakteristik ESBL tipe CTX-M dan SHV dari *Enterobacteriaceae* patogen di RS Dr. Kariadi, serta mengukur kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mengidentifikasi tipe ESBL CTX-M dan SHV.

Metode

Sampel penelitian adalah 30 isolat dari pasien di RS Dr. Kariadi yang telah teridentifikasi secara fenotipik dengan Vitek2 sebagai *Enterobacteriaceae*-penghasil ESBL, kemudian dilakukan pemeriksaan secara genotipik dengan Hybrispot24 RS Universitas Indonesia. Kesesuaian antara kedua 2 alat uji dianalisis dengan *Koefisien Cohen's Kappa*

Hasil

Dari 30 isolat, 1 dieksklusi karena terkontaminasi, 20 isolat adalah *E.coli* dan 9 isolat adalah *Klebsiella pneumoniae*. Vitek2 mengidentifikasi tipe ESBL pada 5 (17%) isolat, yaitu 3 (17%) CTX-M dan 2 (7%) SHV. Hybrispot24 dapat mengidentifikasi gen penyandi-ESBL pada 27 (93%) isolat, yaitu 15 (52%) *bla*CTX-M, 8 (27%) *bla*CTX-M dan *bla*SHV, 2 (7%) *bla*SHV, serta 2 (7%) *bla*SHV dan *bla*GES, suatu gen penyandi-karbapenemase. Kedua isolat ini menurut Vitek2 memiliki MIC meropenem dan ertapenem ≤ 0.25 . Uji Kappa untuk ESBL tipe CTX-M menunjukkan tingkat kesesuaian sangat kurang ($\kappa=3,6\%$), adapun untuk tipe SHV menunjukkan tingkat kesesuaian kurang ($\kappa=24,7\%$).

Kesimpulan

Tipe ESBL terbanyak di RS Dr. Kariadi adalah CTX-M. Identifikasi tipe ESBL CTX-M dan SHV dengan Vitek2 dan Hybridpot24 memiliki kesesuaian yang sangat rendah.

Kata Kunci: Vitek2, Hybrispot24, kesesuaian, dan karakteristik

ABSTRACT

Background:

Identification of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) types is important for antibiotic treatment and can be done phenotypically and genotypically. Vitek2 phenotypically identifies ESBL types such as CTX-M and SHV. Hybrispot24 genotypically identifies CTX-M- and SHV-encoding genes (*bla*CTX-M and *bla* SHV respectively). Despite high incidence of infections caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, Dr. Kariadi Hospital has no data on characteristics/types of ESBL.

Objective:

To identify the characteristics of ESBL CTX-M and SHV of *Enterobacteriaceae* from Dr. Kariadi Hospital inpatients, and to measure the agreement between Vitek2 and Hybrispot24 in detecting ESBL types.

Methods

Samples were 30 isolates from Dr. Kariadi Hospital's inpatients, which had been phenotypically identified as ESBL-producing *Enterobacteriaceae* by Vitek2. Genotypic test was performed using Hybrispot24 in Indonesia University Hospital, Jakarta. The agreement between these two methods was analyzed using Cohen's Kappa coefficient.

Results:

Out of 30 isolates, 1 was excluded because of contamination, 20 were *Escherichia coli* and 9 were *Klebsiella pneumoniae*. Vitek2 identified enzyme-types in 5 (17%) isolates, namely 3 (10%) CTX-M and 2 (7%) SHV. Hybrispot24 identified ESBL-encoding genes in 27 (93%) isolates, namely 15 (52%) *bla*CTX-M, 8 (27%) both *bla*CTX-M and *bla*SHV, 2 (7%) *bla*SHV, and 2 (7%) both *bla*SHV dan *bla*GES (a carbapenemase-encoding gene). The latter two isolates' MIC for meropenem/ertapenem was ≤ 0.025 . The agreement between Vitek2 and Hybrispot24 in identifying CTX-M type was very poor ($\kappa=3,6\%$), while that of SHV type was poor ($\kappa=24,7\%$).

Conclusion:

CTX-M is the most prevalent ESBL-type in Dr. Kariadi Hospital. The agreement between Vitek2 and Hybridpot24 in the identification of ESBL CTX-M and SHV types was very poor.

Keywords: Vitek 2, Hybrispot 24, agreement, ESBL types


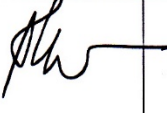
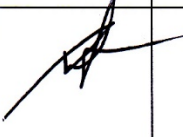
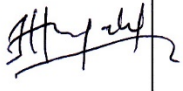

LEMBAR MONITORING PERBAIKAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan dengan sebenarnya bahwa saya telah menyetujui **Perbaikan Tesis** yang telah diajukan pada tanggal 26 September 2019

Nama Mahasiswa : Jihan Samira

NIM : 22200116320005

Judul : Kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam Identifikasi
ESBL Tipe SHV dan CTX-M dari Isolat Enterobacteriaceae
penghasil ESBL

No	Nama	Narasumber	Tanda Tangan	Tanggal
1	Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes	Ketua Tim Penguji		
2	Prof.Dr.dr.Hendro Wahjono,DMM, M.Sc.TropMed,SpMK(K)	Penguji Penguji anggota		
3	dr. Rebriarina Hapsari, M.Sc, Sp.MK	Penguji Penguji anggota		
4	dr.Mujahidah, Sp.MK	Pembimbing I Penguji anggota		
5	dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp.A, PhD	Pembimbing II Penguji anggota		

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam beberapa dekade terakhir infeksi yang diakibatkan oleh bakteri *Enterobacteriaceae* penghasil *Extended-Spectrum beta-lactamase* (ESBL) semakin meningkat di berbagai belahan dunia.¹⁻⁴ Infeksi ini memberikan dampak yang signifikan bagi pasien rawat inap dikarenakan pilihan terapi infeksi untuk bakteri penghasil ESBL sangat terbatas dan menyebabkan angka mortalitas yang lebih tinggi.^{3,5-7} ESBL merupakan enzim yang dapat menghidrolisis antibiotik *beta-lactam* yang mengandung grup *oxymino* seperti sefalosporin generasi ketiga dan aztreonam. Enzim ini dapat dihambat oleh *beta-lactamase* inhibitor seperti asam klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam. ESBL berasal dari *beta-lactamase* yang termutasi. Enzim ini sering ditemukan pada *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* dan basil Gram negatif lainnya.⁸ *Escherichia coli* merupakan patogen oportunistik tertinggi penyebab insidensi infeksi saluran kemih⁹, serta tertinggi sebagai bakteri penghasil ESBLs. *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL bertanggung jawab terhadap kejadian wabah infeksi nosokomial, peningkatan morbiditas dan mortalitas, serta peningkatan biaya kesehatan.^{6, 7, 10-13}

The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program melaporkan peningkatan insiden ESBL pada isolat *Klebsiella* sebesar 7% pada tahun 1997-2000 menjadi 15% pada tahun 2011–2013. Untuk *E. coli* penghasil ESBL dua *national surveillance programs* (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* dan *The Surveillance Network*) melaporkan proporsi ESBL sekitar 1%–8% pada tahun 1997–2000, sementara pada tahun 2011–2013, *the International Network for Optimal Resistance Monitoring program* melaporkan peningkatan proporsi kejadian yaitu sebesar 12%¹⁴ Untuk wilayah Asia, isolat *Klebsiella pneumoniae* penghasil ESBL di China untuk pertama kali dilaporkan pada tahun 1988 dan

prevalensinya terus meningkat.^{15, 16} Survey nasional menunjukkan ESBL pada 5%-8% isolat *Eschericia coli* di Korea, Jepang, Malaysia, dan Singapura, serta mencapai 12%-24% di Thailand, Taiwan, Filipina, India dan Indonesia.¹⁶⁻¹⁹ Di Indonesia sendiri, terutama di RSUP Dr. Kariadi Semarang, selama kurun waktu 2004-2005 didapatkan proporsi bakteri penghasil ESBL sebesar 50,6% berdasarkan tes skrining awal.¹² Hasil survey ESBL di rumah sakit Dr. Soetomo, pada bulan Januari-November 2011 menemukan bahwa kejadian ESBL cukup tinggi yakni 45,32% pada *E. coli* dan 50,28% pada *K. pneumoniae*. Penelitian di Medan, tahun 2012 oleh Mayasari melaporkan dari 282 sampel urin dengan kultur positif, diperoleh kejadian ESBL *E.coli* 18,7%. Dari data di bagian Mikrobiologi RS H Adam Malik Medan, dijumpai kejadian infeksi ESBL yang cukup tinggi. Pada tahun 2012 kejadian ESBL 16,9% (12% ESBL *K. pneumoniae* dan 4,9% ESBL *E.coli*) meningkat menjadi 19,51% (12,24% ESBL *K. pneumoniae* dan 7,17% ESBL *E.coli*) pada tahun 2013.^{7, 10-13}

Metode deteksi ESBL secara umum dapat digolongkan ke dalam dua kelompok yaitu: metode fenotipik dengan menggunakan teknik non molekular, yang memiliki kemampuan deteksi enzim ESBL dalam menghidrolisis berbagai sefalosporin yang berbeda; dan metode genotipik dengan menggunakan teknik molekular yang mendeteksi gen *beta-lactamase*. Pada laboratorium diagnostik klinik yang paling banyak digunakan adalah metode fenotipik karena lebih mudah, biaya lebih murah, serta telah banyak digabungkan dengan sistem uji kepekaan otomatis, sehingga lebih mudah digunakan secara luas. Deteksi mikroorganisme penghasil ESBL sesuai rekomendasi *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)* yaitu berupa skrining dengan menggunakan metoda uji kepekaan antibiotik dengan diffusion cakram dan dilusi (*dilution antimicrobial susceptibility tests*). Selain uji skrining tersebut, deteksi ESBL dapat berupa: Tes Konfirmasi Fenotipik untuk produksi ESBL kombinasi cakram sefalosporin-klavulanat,

uji difusi cakram ganda, uji tiga dimensi, uji dengan agar yang difermentasi dengan klavulanat, dan beberapa metode yang telah tersedia secara komersial.

Salah satu bentuk uji fenotipik komersial untuk mendeteksi ESBL adalah dengan *Vitek2 compact* (bioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri) yang dapat mengidentifikasi kuman, mendeteksi ESBL dan uji kepekaan antibiotik. *Vitek2 compact* merupakan bentuk uji fenotipik yang memiliki tingkat akurasi 90% untuk identifikasi pada family *Enterobacteriaceae*, dan sensitifitasnya 95,9% dalam mendeteksi ESBL. Selain identifikasi dan deteksi ESBL, Vitek2 mampu mendeteksi hingga 100% genotype ESBL jenis *bla*CTX-M-1, 97% jenis *bla*CTX-M-9 dan 92% jenis *bla*SHV.^{15,16}

Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) merupakan pemeriksaan teknik molekuler secara genotipik yang paling dapat diandalkan untuk identifikasi dan konfirmasi ESBL. Metode ini memiliki peran yang signifikan dalam laboratorium mikrobiologi klinis serta penting dalam pemilihan terapi.¹⁷ Macam tipe dan modifikasi PCR adalah *real time* PCR, *nested* PCR, multiplex-PCR, dan PCR-ELISA. Prosedur diagnostik molekuler salah satunya adalah hibridisasi yaitu kemampuan dua untai asam nukleat yang memiliki urutan basa komplementer yang homolog untuk berikatan secara khusus satu sama lain dan membentuk molekul beruntai ganda, atau *duplex* atau *hybrid*. Metode Hybrispot24 dengan *Sepsis flow chips* (SFC) (Master Diagnostika, Granada, Spanyol) merupakan salah satu uji molekuler berbasis *microarray* DNA yang disetujui oleh *European Economic Area* sebagai perangkat yang cocok untuk diagnosis *in vitro*.¹⁸ SFC *assay* berdasarkan amplifikasi PCR multipleks menggunakan primer *biotinylated* diikuti oleh hibridisasi terbalik dengan Hybrispot24 dalam membran yang mengandung probe spesifik untuk mendeteksi patogen yang paling penting yang terkait dengan infeksi dan penentu (determinan) genetik yang paling penting dalam mikroorganisme tersebut. SFC mampu mengidentifikasi 98% bakteri Gram negative beserta gen penentu resistensi, serta

mendeteksi 100% dari strain penghasil ESBL yang membawa *bla*CTX-M dan / atau *bla*SHV.^{19,20}

Karakterisasi genotipe ESBL dapat membantu mengetahui substrat yang dihidrolisis oleh antibiotik dengan mengetahui jenis gen penyandi ESBL, seperti *Temoneira* (TEM), *sulphydryl variable* (SHV) dan *Cefotaxim Munich* (CTX-M) sehingga dapat diketahui antibiotik yang sesuai untuk digunakan sebagai terapi empiris pada daerah tersebut.^{5, 21-25} Gen *bla*SHV-1 dan *bla*TEM-1 memiliki struktur yang mirip, 68 % asam amino yang ada di *bla*SHV-1 juga terdapat di *bla*TEM-1. *bla*SHV-1 sering ditemukan dalam *K. pneumoniae*.^{21,26} Dalam dekade terakhir, genotipe *bla*CTX-M banyak ditemukan pada *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia* dari isolat klinis di seluruh dunia.²¹ ESBL tipe SHV mungkin lebih sering ditemukan diisolat klinis dibandingkan jenis ESBL lainnya.²¹ SHV mengacu pada *sulphidril variabel*. Penunjukan ini dibuat karena dianggap menghambat aktivitas SHV oleh p-chloromercuribenzoate berhubungan dengan substrat, dan bervariasi sesuai dengan substrat yang digunakan untuk pengujian. Pada tahun 1983 di Jerman ditemukan isolate *Klebsiella ozaenae* yang menghasilkan ESBL tipe SHV dengan ciri menghidrolisis sefotaksim lebih besar dibandingkan seftazidime. Karakteristik untuk ESBL tipe CTX-M mencerminkan aktivitas hidrolitik yang kuat dari enzim *beta-lactamase* ini terhadap sefotaksim.^{15,18} Beberapa ESBL tipe CTX-M sebenarnya dapat menghidrolisis ceftazidime dan memberi resistensi terhadap sefalosporin ini (MIC setinggi 256 g / ml).^{15,18}

Penelitian di Indonesia tentang karakteristik molekuler dilaporkan dari Surabaya yang mendapatkan hasil bahwa *bla*CTX-M-15 merupakan gen *beta-lactamase* dengan prevalensi paling tinggi pada *Escherichia coli* diikuti oleh *Klebsiella pneumonia*.¹⁹ Penelitian lain tentang identifikasi *bla*CTX-M pada *Escherichia Coli* penghasil *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya menunjukkan

bahwa dari tiga puluh isolat yang digunakan, sebanyak dua puluh tujuh isolat (90%) positif mengandung gen CTX-M.^{26,27}

Penderita infeksi oleh ESBL akan mengalami peningkatan resiko kegagalan terapi menggunakan antibiotik *beta-lactam* spectrum luas. Sebagian galur produsen ESBL memiliki *over-resistance* terhadap antibiotik *beta-lactam* berspectrum luas, tetapi sebagian lagi secara fenotip "tidak resisten" menurut kriteria CLSI.²⁷ Sampai saat ini RSUP DR Kariadi Semarang belum memiliki data karakteristik genetik dari bakteri *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL yang dapat digunakan dalam pemberian terapi pada pasien. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data tentang karakteristik genetik isolat ESBL dari pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi Semarang, serta menguji kesesuaian Vitek2 dengan Hybrispot24 dalam mengidentifikasi ESBL tipe SHV, dan CTX-M.

1.2 Permasalahan Penelitian

- 1.2.1. Bagaimana gambaran karakteristik genetik dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL pada pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi Semarang.
- 1.2.2. Bagaimana kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi ESBL Tipe SHV dan CTX-M dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi ESBL tipe SHV dan CTX-M dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dari isolat klinis pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengidentifikasi karakteristik genetik dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dari isolat klinis pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi

- b. Mengukur kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi ESBL tipe SHV dan CTX-M dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dari isolat klinis pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat untuk pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang karakteristik genetik dan kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi ESBL tipe SHV dan CTX-M dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL

1.4.2 Manfaat untuk masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pemilihan terapi antibiotik bagi para klinisi pada pasien dengan infeksi ESBL, dan diharapkan dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas.

1.4.3 Manfaat untuk penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan bagi penelitian selanjutnya

1.5 Orisinalitas Penelitian

Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
AMRIN study,2010	Karakteristik molekuler <i>extended-spectrum beta-lactamase</i> pada isolat <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumonia</i> di Surabaya, Indonesia	Observasional,	gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} ditemukan dengan prevalensi tinggi (69/73 strain, 94.5%) dari 73 isolat <i>E.coli</i> ESBL-positive. Dari 72 isolat <i>K.pneumoniae</i> ESBL-positive, gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} menunjukkan prevalensi terbanyak (40/72, 55.6%). Beberapa tipe SHV juga dideteksi, seperti SHV-5 (n = 28); SHV-12 (n = 13); dan SHV-2 (n = 6). EBL tipe TEM ESBL tidak terdeteksi pada isolat.

Winarto, 2005	Prevalensi kuman ESBL dari material darah di RSUP dr Kariadi Semarang tahun 2004-2005	Retrospektif	Hasil kultur positif 34,76%, kuman ESBL didapatkan 50,9% dengan predominan <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> dan <i>E. coli</i> . Kuman ESBL di ruang perawatan intensif lebih banyak, dengan sensitifitas antibiotika yang masih baik ialah meropenem, aminoglikosida dan kuinolon.
Yulianto Ade Prasetya, 2014	Identifikasi gen <i>bla</i> CTX-M pada <i>E.coli</i> penghasil ESBL di RSUD Dr.Soetomo Surabaya	Observasional deskriptif dengan pendekatan molekuler	sebesar 90% (27/30) isolat <i>E.coli</i> penghasil ESBLs positif mengandung gen <i>bla</i> CTX-M dengan prevalensi tertinggi ditemukan di Ruang Interna sebanyak 11 isolat dan dilanjutkan di Ruang IRJ, ruang Anak dan Ruang Bedah, Ruang Jiwa, Ruang Kulit, dan Ruang Saraf .
Md. Hasanul Karim ^{1,3*} , Sayad Md. Didarul Alam ² and Tanzima Yeasmin, 2014 ¹⁸	Identifikasi molekuler gen <i>bla</i> TEM dan <i>bla</i> SHV pada isolate <i>E.coli</i> dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> penghasil ESBL di RS tersier, Bangladesh	Observasional deskriptif dengan pendekatan molekuler	Dari 50 sample, 41 strain PCR positive. Pada isolat <i>E. coli</i> , 36% memiliki gen <i>bla</i> TEM and <i>bla</i> SHV; 40% memiliki gen <i>bla</i> TEM; 8% memiliki gen <i>bla</i> SHV; 16% menunjukkan PCR negatif dan memiliki gen lain. Pada isolate <i>K. pneumoniae</i> , 40% strain memiliki kedua gen <i>bla</i> TEM dan <i>bla</i> SHV ; 28% memiliki gen <i>bla</i> TEM ; 12% memiliki gen <i>bla</i> SHV; 20% PCR negatif dan memiliki gen lainnya.
Dr.Savitha Rani ¹ , Dr.I.Jahnavi ² , Dr.K.Nagamani, 2018 ²⁸	Karakteristik fenotipik dan Molekuler <i>Enterobacteriaceae</i> penghasil ESBL di RS tipe tersier	Prospektif	Dari 240 isolat bakteri gram negatif, 35.8% dikonfirmasi secara fenotipik penghasil ESBL. Organisme yang dominan adalah <i>E.coli</i> 61.62%. Semua isolat 100% resisten terhadap sefalosporin generasi 3, 100% sensitif terhadap karbapenem, gen yang dominan adalah <i>bla</i> CTX-M

			71.9%, Kombinasi gen yang paling banyak ditemukan adalah <i>bla</i> CTX-M dan <i>bla</i> SHV dengan 12.82%.
Woori Jang, Yeon-Joon Park*, Kang Gyun Park and Jinkyung Yu, 2013. ²⁹	Evaluasi MicroScanWalkAway dan Vitek2 dalam menentukan Kerentanan isolat <i>Escherichia coli</i> dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> penghasil ESBL terhadap sefepim, sefotaksim dan seftazidim	Observasional	Isolat diklasifikasikan berdasarkan suseptibilitasnya terhadap sefepim dan seftazidim dengan pedoman CLSI dan EUCAST, dengan hasil masing - masing 35,0% dibandingkan 2,3% untuk cefepime (P, 0,001) dan 21,8% dibandingkan 8,2% untuk seftazidim (P, 0,001), dan isolat yang rentan terutama adalah CTX-M-9 atau produsen ESBL tipe SHV. Semua isolat resisten terhadap sefotaksim
Antonio Galiana, Javier Coy, Adelina Gimeno, Noemi Marco Guzman2017	Evaluasi Sepsis flow chip assay untuk diagnosis infeksi darah.	Observasional	SFCassay memiliki sensitivitas dan spesifisitas identifikasi bakteri masing-masing 93,3% dan 100%. sensitivitas dan spesifisitas untuk identifikasi resistensi genetik antibiotik adalah 93,6% dan 100% masing-masing.

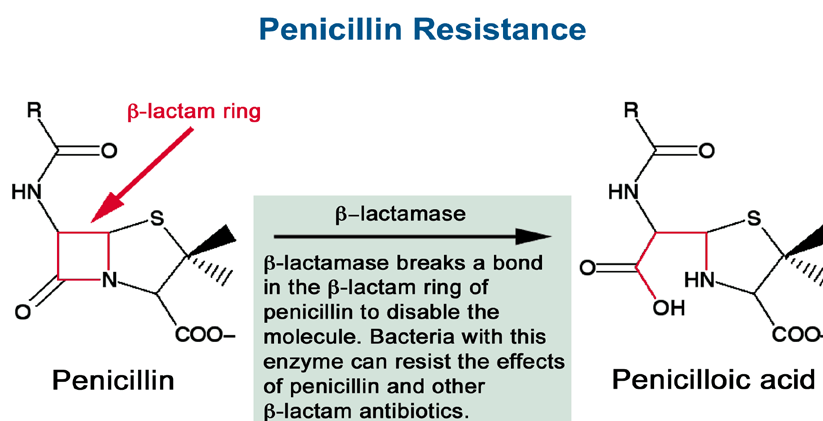
Penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya dalam hal desain penelitian, yaitu uji kesesuaian (*aggrement*) antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antibiotik *Beta-lactam*

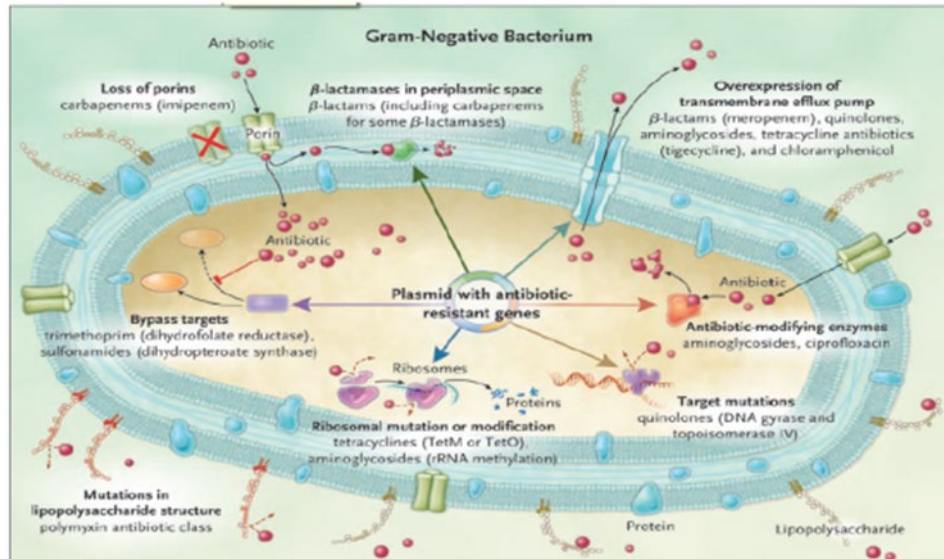
Antibiotik *beta-lactam* seperti penisilin, sefamisin dan karbapenem, dan sefalosporin merupakan obat anti bakteri karena potensinya yang tinggi terhadap bakteri Gram positif maupun negatif, dan efek samping yang minimal. Antibiotik ini banyak digunakan dalam pengobatan berbagai infeksi, seperti paru, saluran kemih, dan infeksi pada aliran darah. Namun, penggunaan antibiotik secara luas telah meningkatkan masalah resistensi antibiotik terhadap bakteri.^{30, 31} Antibiotik golongan ini memiliki unsur yang sama dalam struktur molekulnya yaitu 4 cincin atom dan disebut sebagai *beta-lactam*. Untuk mengatasi kerja dari antibiotik *beta-lactam*, bakteri menghasilkan enzim, yang disebut dengan enzim *beta-lactamase* yang bekerja merusak cincin *beta-lactam* dari penisilin melalui proses hidrolisis (gambar 1). Sehingga bakteri tetap dapat membentuk dinding sel bahkan ketika diberikan antibiotik *beta-lactam*.



Gambar 1. Mekanisme resistensi penisilin.

Salah satu mekanisme resistensi terhadap antibiotik *beta-lactam* adalah kemampuan bakteri menghasilkan enzim *beta-lactamase* yang menghidrolisis cincin *beta-lactam* dari antibiotik *beta-lactam* generasi awal seperti penisilin, ampisilin, amoksisilin.

Dibawah ini adalah gambar yang menunjukkan tujuh mekanisme resistensi yang ditunjukkan pada bakteri Gram negatif, dengan beberapa antibiotika yang dimediasi oleh plasmid.⁴



Gambar Mekanisme resistensi bakteri Gram negatif terhadap beberapa antibiotika⁴

1. Mekanismenya yaitu dengan hilangnya porin yang dapat mengurangi pergerakan obat melalui membrane sel seperti yang terjadi pada imipenem.
2. Adanya enzim *beta-lactamase* dalam ruang periplasma, yang dapat mendegradasi *beta-lactam* pada antibiotic golongan *beta-lactam* dan carbapenem.
3. Peningkatan ekspresi pompa transmembran, yang berguna menghilangkan obat dari bakteri sebelum dapat mencapai efek, terjadi pada antibiotik golongan quinolone, aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol dan meropenem.
4. Adanya bakteri yang dapat memodifikasi enzim, sehingga antibiotik tidak mampu berinteraksi dengan target seperti pada antibiotic ciprofloxacin.
5. Mutasi target obat yang mencegah antibiotik untuk mengikat target kerja.
6. Mutasi ribosom atau memodifikasi yang dapat mencegah antibiotik untuk mengikat serta menghambat sintesis protein.
7. Mekanisme memotong metabolic dengan menggunakan enzim alternatif sehingga terjadi efek penghambatan antibiotik. Mutasi pada

lipopolisakarida, yang membuat polimiksin antibiotik dapat mengikat target ini

2.2 *Beta-lactamase* dan *Beta-lactamase* Spektrum Luas (*Extended Spectrum Beta-lactamase/ ESBL*)

Setelah munculnya resistensi terhadap golongan *beta-lactam* generasi awal, banyak obat-obatan baru yang dikembangkan untuk melawan resistensi ini. Turunan dari antibiotik ini disebut dengan *beta-lactam* spektrum luas (*extended spectrum beta-lactams*), penggunaan antibiotik sefalosporin spektrum luas semakin banyak digunakan dalam dua dekade terakhir. Penggunaan obat ini secara luas dan tidak tepat mengakibatkan munculnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik tersebut, dengan menghasilkan enzim *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL). ESBL adalah enzim yang dapat menyebabkan resistensi terhadap hampir seluruh antibiotik *beta-lactam*, termasuk penisilin, sefalosporin, dan monobaktam aztreonam.³² Enzim-enzim ESBL mempunyai kemampuan yang bervariasi terhadap berbagai substrat *beta-lactam* oxyimino, tetapi tidak dapat menghidrolisis sefamisin (sefoksitin, sefotetan dan sefmetazole) dan karbapenem (imipenem, meropenem, doripenem, dan ertapenem). Enzim-enzim ini dapat dihambat aktivitasnya oleh inhibitor *beta-lactamase*, seperti klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam. Enzim-enzim ESBL ini ditemukan secara khusus pada bakteri Gram negatif dari *family Enterobacteriaceae*, terutama *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, dan *Eschericia coli*. Akan tetapi, enzim-enzim ini dapat juga ditemukan pada *non-Enterobacteriaceae* seperti *Acinetobacter*, *Burkhlorderia*, *Morganella*, dan *Pseudomonas*.³²

Kelompok dari enzim-enzim ESBL ini bersifat heterogen. Enzim tipe SHV dan TEM muncul dari pergantian asam amino yang memungkinkan enzim dengan spektrum yang lebih sempit untuk menyerang beta laktam oxyimino baru. Kelompok lainnya, yaitu golongan CTX-M, mempunyai kemampuan menghidrolisis *beta-lactam* dengan spektrum

luas, yang didapat dari plasmid, yang ditentukan oleh gen-gen kromosom. Famili enzim ESBL yang lain yang telah cukup lama dikenal adalah OXA *beta-lactamase*, agak jarang ditemukan dan dimediasi oleh plasmid. OXA *beta-lactamase* dapat menghidrolisis oksasilin dan berhubungan dengan penisilin anti-stafilokokus. Enzim *beta-lactamase* yang lain, seperti PER, VEB, dan GES telah dilaporkan tetapi sangat jarang dan terutama ditemukan pada *P. aeruginosa* dan hanya didapati pada daerah geografis tertentu. Enzim ESBL lainnya, yang juga cukup jarang, dan ditemukan pada *Enterobacteriaceae* antara lain BES, SFO, dan TLA.³²

2.2.1 Klasifikasi *Beta-lactamase*

Saat ini sudah ditemukan lebih dari 700 jenis *beta-lactamase* sehingga perlu dibuat suatu klasifikasi agar mempermudah identifikasi enzim ini. Terdapat banyak cara yang digunakan untuk mengklasifikasikan *beta-lactamase*, namun yang sering digunakan adalah klasifikasi menurut *Ambler molecular* dan Bush-Jakoby-Mederos *functional classification*. Ambler membagi *beta-lactamase* kedalam empat kelompok utama (A sampai D).^{21, 33} Dasar pembagian ini terletak pada homologi protein (kesamaan dalam asam amino), bukan karakteristik fenotipnya. *Serine beta-lactamase* adalah dasar klasifikasi *beta-lactamase* kelas A, C, dan D, sebaliknya enzim kelas B adalah *Metallo-beta-lactamase*. Klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros membagi grup *beta-lactamase* berdasarkan kesamaan fungsi (substrat dan profil inhibitor). Ada empat grup utama dan beberapa subgrup dalam sistem ini. Klasifikasi ini lebih relevan untuk praktisi medis atau mikrobiologi di laboratorium karena berdasarkan kepekaan terhadap inhibitor *beta-lactamase* dan jenis substrat *beta-lactamase*.^{21, 33, 34}

2.2.2 Klasifikasi Ambler

Berikut merupakan tabel klasifikasi oleh Ambler yang dibagi menjadi empat kelas.

Tabel 2. Klasifikasi Ambler³³

	Kelas	beta-laktamase	Contoh
<i>Serine beta-lactamase</i>	A	<i>Broad spectrum beta-lactamase</i> ESBL TEM-type ESBL SHV-type ESBL CTX-M-type	TEM-1, TEM-2 SHV-1 TEM-3 SHV-5 CTX-MI, CTX-M9
	C	Carbapenemases AmpC sefamisinases (chromosomal encode) AmpC sefamisinases (Plasmid encode)	KPC AmpC CMY, DHA
	D	<i>Broad spectrum beta-lactamase</i> ESBL-OXA-type Carbapenemases	OXA-1, OXA-9 OXA-2, OXA-10 OXA-48, OXA-23
<i>Metallo beta-lactamase</i>	B	<i>Metallo beta-lactamase</i>	VIM, IMP

TEM: Temorina *E-coli* variant, SHV: *Sulphydryl variant*, ESBLs: *Extended spectrum beta-lactamases*. OXA: *Oxacillanase*

Kelas A, C, dan D merupakan *serine-beta-lactamase* yang menggunakan lokasi aktif serine untuk mengkatalisa hidrolisis, sedangkan kelas B *beta-lactamase* adalah metalloenzim yang membutuhkan satu atau dua ion zink untuk aktivitasnya.

1) *Beta-lactamase* Kelas A

Terdiri dari penisilinase kromosomal dan dimediasi plasmid, sefalosporinase dan karbapenemase yang memiliki serine pada sisi aktifnya.

- Penisilinase (PCI), yang menghidrolisis benzilpenisilin lebih efisien dari pada sefalosporin. Golongan ini dihambat oleh asam klavulanat.

- *Penicilinase* dan *early sefalosporinase* (TEM-1, TEM-2, SHV-1), yang sama sama menghidrolisis penisilin dan sefalosporin. Golongan ini dapat dihambat dengan asam klavulanat.
- *Extended-spectrum beta-lactamase* (SHV-2, TEM-3, CTX-M-15), yang menghidrolisis sefalosporin 10% lebih cepat dibandingkan dengan penisilinase. Golongan ini dapat menghidrolisis oxyimino-sefalosporin dan monobaktam dan dapat dihambat oleh asam klavulanat.
- Penisilinase (TEM-30, SHV-10), yang resisten terhadap asam klavulanat, tazobaktam dan sulbaktam.
- *Extended-spectrum sefalosporinase* (TEM-50), yang menghidrolisis extended spectrum sefalosporin dan monobaktam namun resisten terhadap asam klavulanat, tazobaktam dan sulbaktam.
- *Extended-spectrum sefalosporinase* (CepA), yang dapat menghidrolisis sefalosporin namun tidak aztreonam. Golongan ini dapat dihambat oleh asam klavulanat.
- Karbenisilinase (PSE-1, CARB-3), yang menghidrolisis karbenisilin dan sensitif terhadap asam klavulanat.
- Karbenisilinase (RTG-4), yang juga menghidrolisis sefepim dan sefpirome, namun dapat dihambat oleh asam klavulanat.
- Karbapenemase (KPC-2, IMI-1, SME-1), yang dapat menghidrolisis oxyimino-sefalosporin, sefamisin dan karbapenemase. Sensitivitasnya terhadap asam klavulanat bervariasi.

2) *Beta-lactamase* Kelas B

Karbapenemase dengan ion zink pada daerah aktifnya ini juga dikenal sebagai *metallo-beta-lactamase*. Enzim ini dapat menghidrolisis penisilin, sefalosporin, karbapenem,

dan resisten terhadap inhibitor *beta-lactamase*. Meskipun demikian, aktivitas hidrolisisnya tidak berkembang pada aztreonam. Gen *bla*MBL berlokasi pada kromosom, plasmid dan integron.

3) *Beta-lactamase* Kelas C

Sefalosporinase dengan serine di daerah aktifnya. Golongan ini dikode oleh gen yang ada pada kromosom bakteri, namun pengkodean oleh plasmid mulai banyak ditemukan. Golongan ini dikode oleh kromosom pada *Enterobacter* spp dan *Citrobacter* spp namun pada *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp dan *Proteus* spp lebih sering dikode oleh plasmid. Isolat yang menghasilkan enzim ini menjadi resisten terhadap aminopenisilin, oxyimino-sefalosporin, sefamisin dan inhibitor *beta-lactamase*. Juga resisten terhadap sefalosporin spektrum luas yang meliputi sefotaksim, seftazidim, dan seftriakson dan infeksi khususnya disebabkan oleh *E.aerogenes* dan *E.cloacae*. Enzim AmpC tidak menghidrolisis sefepim dan dihambat oleh kloksasilin, oksasilin dan aztreonam.

4) *Beta-lactamase* Kelas D

Enzim ini awalnya dikategorikan sebagai oksasilinase karena kemampuannya untuk menghidrolisis oksasilin pada kecepatan minimal 50% dari benzyl penisilin. Sehingga enzim ini disebut *beta-lactamase* tipe OXA. Pertama dilaporkan di Turki pada tahun 1991, enzim ini juga resisten terhadap penisilin dan sefalosporin. OXA-type ESBL (OXA-11, -15) resisten terhadap oxyimino-sefalosporin. OXA-type carbapenemase (OXA-23, -48) dapat menghidrolisis karbapenem. Sebagian besar enzim OXA resisten terhadap asam klavulanat, sulbaktam dan tazobaktam. Meskipun begitu terdapat pengecualian pada OXA-2 dan OXA-32 yang dihambat tazobaktam namun tidak sulbaktam dan asam klavulanat, dan OXA-53 dihambat oleh asam klavulanat.

Klasifikasi molekuler oleh Ambler ini lebih luas diterima dibandingkan dengan klasifikasi fenotipik Bush karena lebih sederhana dan memiliki hubungan filogenetik diantara enzimnya.

2.2.3 Klasifikasi Bush-Jacoby Medeiros

Klasifikasi Bush-Jacoby Medeiros berdasarkan kesamaan fungsional (substrat dan profil inhibitor). Skema klasifikasi ini lebih relevan untuk dokter atau ahli mikrobiologi dalam diagnostik laboratorium karena mempertimbangkan *beta-lactamase inhibitor* dan substrat *beta-lactam* yang relevan secara klinis.

Tabel 3. Klasifikasi *beta-lactamase* berdasarkan *Bush-Jacoby Medeiros*^{5, 21, 35}

Functional group	Substrate profile	Molekuler Class	Inhibitor	Representative
1	Sefalosporinase	C	OXA	AmpC, MIR-1
2a	Penicilinase	A	Clav	<i>S.aureus</i>
2b	Broad spectrum	A	Clav	Tem-1/2, SHV-1
2be	Extended	A	Clav	Tem-3-29, Tem-46, Tem- 104, SHV-2-28, CTX-M types
2br	Inhibitor resistant	A	-	Tem-30-41(IR 1-12)
2c	Carbenicilinase	A	-	AER-1 (C), CARB-3
2d	Oxacilinase	D	Clav	PSE-1
2e	Sefalosporinase	A	Clav	OXA-1, OXA-2, 10
2f	Carbapenemase		Clav	IPM-1, NmcA, Smc1-3
3	Metalloenzymes	A	-	<i>S.maltophilia</i>
4	Penicilinase	B	-	<i>B.cepacia</i> (c)

TEM: Temorina *E-coli* variant, SHV: Sulfhydryl variant, ESBLs: Extended spectrum beta-lactamases. OXA: Oxacillanase

Golongan 1 adalah sefalosporinase yang tidak dapat dihambat oleh asam klavulanat, yang berhubungan dengan kelas C. Golongan 2 adalah penisilinase, sefalosporinase, dapat dihambat oleh asam klavulanat, analogis dengan kelas molekul A dan D menunjukkan gen TEM dan SHV. Selain itu, banyak kelas A TEM *beta-lactamase* dapat dihambat oleh protein *beta-lactamase inhibitor* (BLIP). Karena meningkatnya jumlah *beta-lactamase* TEM dan SHV, kelas molekul ini dibagi menjadi dua subkelas yaitu 2a dan 2b. Subkelompok 2a termasuk dalam kelompok penisilinase.

Dalam mekanisme resistensinya subkelompok 2a dapat menghidrolisis sefalosporin dengan kecepatan $\leq 10\%$ dibandingkan kecepatannya dalam menghidrolisis benzilpenisilin atau ampisilin. Subkelompok 2a dan 2b merupakan *beta-lactamase* spectrum luas, yang mampu menonaktifkan penicillin dan sefalosporin dengan mekanisme yang sama. Bahkan, subkelompok 2b terbagi menjadi subkelompok 2be dan 2br. Subkelompok 2be, dengan huruf "e" untuk spektrum aktivitas yang diperluas, mewakili ESBL, yang mampu menginaktivasi sefalosporin generasi ketiga seperti seftazidim, sefotaksim, dan sefpodoksim juga aztreonam. Subkelompok 2br, dengan huruf "r" menunjukkan penurunan ikatan terhadap asam klavulanat dan sulbaktam, ini juga disebut sebagai enzim TEM-derivatif resisten inhibitor, yang umumnya masih sensitif terhadap tazobactam, dimana substitusi asam amino ada pada posisi met69. Subkelompok 2c dipisahkan dari kelompok 2 karena enzim ini menonaktifkan karbenisilin lebih dari benzyl penicillin, dengan beberapa efek pada kloksasilin. Subgroup 2d menonaktifkan kloksasilin lebih kuat dari benzyl penicillin, serta beberapa aktivitas melawan karbenisilin, enzim ini tidak banyak dihambat oleh asam klavulanat. Pada beberapa klasifikasi menyebut kelompok ini sebagai ESBL yang termasuk dalam "Oksasillinase". Enzim ini mampu

untuk menginaktivasi oksazolidinon sebagai oksasillin, dan kloksasillin. Berdasarkan pembagian dari *Amler's molecular classification* enzim milik kelas molekuler D bukan kelas molekuler A. Subkelompok 2e enzim adalah sefalosporinase yang juga dapat menghidrolisis monobaktam, dan dihambat oleh asam klavulanat. Subkelompok 2f merupakan karbapenemase berbasis. Dalam melawan ikatan zink karbapenemase termasuk dalam kelompok 3. Kelompok 3 adalah enzim berbasis zink atau disebut juga *metallo beta-lactamase*, sesuai dengan kelas molekul B, yang merupakan satu-satunya enzim yang bekerja dengan ion zink logam. *Metallo beta-lactamase* mampu menghidrolisis penisilin, sefalosporin, juga carbapenem, Jadi carbapenem dihambat oleh kedua kelompok 2f (mekanisme berbasis serin) dan kelompok 3 (mekanisme berbasis zink). Kelompok 4 adalah penisilinase yang tidak dapat dihambat dengan asam klavulanat, dan mereka tidak memiliki kelas molekuler yang sesuai.^{35 7}

2.3 Epidemiologi ESBL

ESBL pertama kali ditemukan pada tahun 1980-an, saat itu para peneliti telah menemukan adanya enzim yang dapat menimbulkan mutasi gen jenis TEM dan SHV, yang menghasilkan resistensi terhadap antibiotik golongan *beta-lactam*.³⁶ Mutasi dalam gen menghasilkan aktivitas katalitik yang tinggi untuk beta-laktam karena afinitasnya yang tinggi untuk senyawa jenis TEM dan SHV yang telah diakui di seluruh dunia dengan lebih dari 100 mutasi yang dilaporkan bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi sefalosporin spektrum luas.³⁷ Di seluruh dunia, pada 150 juta penderita infeksi saluran kemih per tahun dan sekitar 35% dari mereka juga menderita infeksi nosokomial. Prevalensi bakteri yang memproduksi ESBL bervariasi secara global di seluruh dunia.³⁸

1. Amerika Serikat

Laporan pertama ESBLs di Amerika Serikat pada akhir 1980-an didapatkan enzim tipe TEM dan SHV, dengan angka prevalensi resistensi tipe CTX-M yang masih rendah.

2. Eropa.

Penelitian di Eropa menunjukkan *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL telah menyebar pada tingkat yang berbahaya. Terdapat perbedaan prevalensi secara geografis di negara-negara Eropa. Isolat pertama ditemukan di Jerman dan Inggris; Namun, wabah besar pertama terlihat di Perancis pada tahun 1986, di mana lebih dari 50 pasien di unit perawatan intensif (ICU) terinfeksi melalui penyebaran dari bangsal lain di rumah sakit.

3. Timur Tengah (negara-negara Arab)

Studi di Timur Tengah mengungkapkan prevalensi ESBL lebih tinggi daripada di bagian dunia yang lain. Sebuah surveilans *E.coli* penghasil ESBL di Mesir yang dilakukan pada tahun 1999 hingga 2000, menunjukkan bahwa 38% dari *E. coli* dinyatakan positif ESBL. Dalam studi lain di Iran pada tahun 2007 dan 2008, 45% dari *K.pneumoniae* yang diisolasi dari infeksi saluran kemih ditemukan menghasilkan ESBL. Dalam penelitian yang sama, terdeteksi bahwa 59,2% dari *K. pneumoniae* dari isolat klinis dari infeksi saluran pernafasan yang diuji menunjukkan hasil positif penghasil ESBL. Pada 2007 dalam sebuah penelitian pada *K. pneumoniae* menunjukkan perbedaan dalam produksi ESBL di berbagai kota. Di Arab Saudi, sekitar 26% *K. Pneumoniae* yang diisolasi pada tahun 2008 menghasilkan ESBL. Pada sebagian besar isolat, gen SHV-12, CTX-M-15 dan TEM-1 bertanggung jawab atas terjadinya resistensi terhadap sefalosporin.³⁸

4. Australia

Laporan pertama ESBL di Australia ditemukan pada isolat *Klebsiella spp* yang resisten terhadap gentamisin yang dikumpulkan pada tahun 1986 hingga 1988. Mereka menemukan gen SHV pada *Klebsiella spp* sebagai penghasil ESBL. Penelitian yang dilakukan oleh grup *antimicrobial resistance di Australian* tahun 2014 menemukan kejadian ESBL pada kuman *Escherichia coli* 9.0%, 7.8% pada *Klebsiella pneumoniae*, dan 8.0% *K. oxytoca*.³⁹

5. Asia

Isolat pertama *K. Pneumoniae* dengan SHV-2 dilaporkan di Cina pada tahun 1988.⁴⁰ Akhir-akhir ini studi tentang ESBL di Asia menunjukkan prevalensi yang tinggi di antara strain klinis lainnya. Pada tahun 2001, strain positif CTX-M pertama dilaporkan di New Delhi. Beberapa penelitian tentang isolasi terbatas yang dikumpulkan pada tahun 1998 hingga 1999, menunjukkan bahwa 30,7% dari *K. pneumoniae* dan 24,5% dari isolat *E.coli* adalah penghasil ESBL. Di Cina, antara tahun 1997 hingga 1999, 27% *E. coli* dan *K.pneumonia* diidentifikasi sebagai produsen ESBL. Diperkirakan bahwa 5 - 8% dari isolat *E. coli* dari negara-negara di Asia seperti Korea, Jepang, Malaysia dan Singapura adalah ESBL positif, dan 12-24% di Thailand, Taiwan, Filipina, dan Indonesia. Namun, *K. pneumonia* penghasil ESBL kurang dari 5% sementara di negara-negara Asia lainnya berkisar antara 20 hingga 50%.³⁹

Predileksi ESBL untuk *K. pneumoniae* belum dilaporkan secara jelas. Perlu diperhatikan bahwa enzim utama ESBL, yaitu TEM-1, tersebar luas dibandingkan jenis enzim lainnya. Hampir semua isolat *K. pneumoniae* non-ESBL memiliki kromosom yang dimediasi SHV-1 *beta-lactamase*.

Di Indonesia sendiri, terutama di RSUP Dr. Kariadi Semarang, selama kurun waktu 2004-2005 didapatkan infeksi oleh bakteri penghasil ESBL sebesar 50,6% berdasarkan tes skrining awal.¹² Hasil penelitian *Antimicrobial Resistance in Indonesia: prevalence and prevention* (AMRIN Study) di RS dr. Soetomo Surabaya tahun 2010-2011 menemukan bahwa kejadian ESBL cukup tinggi yakni 29% pada *E. coli* dan 36% pada *K. pneumoniae*. Penelitian di Medan, tahun 2012 oleh Mayasari melaporkan dari 282 sampel urin dengan kultur positif, diperoleh kejadian ESBL *E.coli* 18,7%. Dari data di bagian Mikrobiologi RS H. Adam Malik Medan, dijumpai kejadian infeksi ESBL yang cukup tinggi. Pada tahun 2012 kejadian ESBL 16,9% (12% ESBL *K. pneumoniae* dan 4,9% ESBL *E.coli*) meningkat menjadi 19,51% (12,24% ESBL *K. pneumoniae* dan 7,17% ESBL *E.coli*) pada tahun 2013.

2.4 Jenis *Extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL)

1. SHV

ESBL SHV merupakan tipe yang sering ditemukan pada isolat klinis jika dibandingkan jenis enzim ESBL lainnya. SHV mengacu pada variabel *sulphydril* (*sulphydril variable*) dan termasuk dalam grup 2be. SHV-1 sering ditemukan dalam *K. pneumoniae*. Sekitar 20% resistensi terhadap ampisilin yang diperantarai-plasmid disebabkan oleh organisme ini. Saat ini telah ditemukan ESBL golongan SHV pada *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Acinetobacter spp.* Terdapat lebih dari 100 jenis variasi dari tipe SHV. SHV-1 dan TEM-1 memiliki struktur yang mirip. Enam puluh delapan persen asam amino yang ada di SHV-1 juga terdapat di TEM-1.²¹

2. TEM

Klasifikasi TEM berdasarkan perbedaan perubahan kombinasi asam amino. ESBL. Golongan ini merupakan turunan dari TEM-1 dan TEM-21. TEM-1 sering dijumpai pada bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, *H. influenza*, *N. gonorrhoeae* dan *K pneumoniae*. TEM-1 dihasilkan oleh bakteri Gram negatif dan umumnya resisten terhadap ampisillin.²¹ TEM-1 ini pertama kali diidentifikasi dari isolat *E. coli* di Athena, Yunani dan disebut “*Temoneira*” sehingga sejak itu digunakan istilah TEM. TEM-1 memiliki daya hidrolisis yang sangat kuat terhadap ampisillin, namun lemah terhadap karbenisilin, oksasilin, sefalotin, atau sefalosporin. Kemampuan hidrolisis enzim ini dihambat oleh asam klavulanat.²¹

TEM-2 memiliki profil hidrolitik yang sama seperti TEM-1. Perbedaan kedua TEM ini yaitu pada TEM-1 memiliki kemampuan alamiah yang lebih aktif dan berbeda dalam titik isoelektrik. Saat ini telah dilaporkan lebih dari 100 *beta-lactamase* tipe TEM dengan titik isoelektrik berkisar 5,2 – 6,5. Sebagian besar dari enzim ini adalah ESBL. ESBL TEM juga telah ditemukan pada *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* dan *Salmonella species*, dan *P.aeruginosa* Khusus *P.aeruginosa*, organisme ini memproduksi TEM-42.²¹

3. CTX-M

Enzim ini memiliki aktivitas hidrofilik terhadap sefotaksim dibandingkan terhadap *oxymino-beta-lactam* lainnya, seperti seftazidim, seftriakson atau sefepime. Mutasi enzim ini memiliki hubungan erat dengan gen plasmid pengkode beta-laktamase yang ditemukan pada spesies *Kluyvera* (grup organisme komensal), misalnya kromosom yang mengkode beta-laktamases *Kluyvera georgiana* juga mengkode ESBL KLUG-1, ternyata jenis ESBL ini memiliki 99% kesamaan asam amino dengan CTX-M-8. Enzim ini banyak ditemukan di *Salmonella enterica serovar*

typhimurium dan *E. coli*, juga dapat ditemukan di spesies lain golongan *Enterobacteriaceae*. Tipe ini banyak ditemukan di Amerika selatan. *Beta-lactamase* tipe CTX-M memiliki kesamaan dengan ESBL TEM dan SHV, namun kesamaan ini biasanya < 40 %. Saat ini ESBL jenis ini memiliki banyak tipe dan sudah terdeteksi hampir di seluruh belahan dunia.

4. OXA

OXA mampu menghidrolisis antibiotik golongan oksasilin. Enzim *beta-lactamase* ini termasuk grup 2d dan *class D* karena struktur molekul dan fungsinya berbeda jika dibandingkan dengan golongan TEM dan SHV. OXA-1 adalah jenis yang sering ditemukan. OXA sering ditemukan pada *P. aeruginosa*, namun telah dilaporkan bahwa ESBL golongan ini juga terdeteksi di bakteri Gram negatif lainnya. Saat ini telah dilaporkan bahwa sekitar 10 % dari *E. coli* dapat menghasilkan ESBL golongan ini. Kebanyakan *beta-lactamase* OXA tidak menghidrolisis antibiotik golongan sefalosporin, sehingga sering tidak dianggap sebagai ESBL, namun kini telah dilaporkan bahwa OXA-10 ternyata mampu menghidrolisis sefotaksim, seftriakson, dan aztreonam, walaupun kemampuan hidrolisisnya lemah.

5. PER

ESBL tipe PER memiliki kesamaan dengan TEM dan SHV sebanyak 25 – 27 %. *Beta-lactamase* PER-1 mampu menghidrolisis penicillin dan sefalosporin, namun dapat dihambat oleh asam klavulanat. PER-1 pertama kali terdeteksi dari isolat *Pseudomonas aeruginosa*, namun kini telah ditemukan di isolat *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* dan *Acinetobacter*. Saat ini PER-1 baru dilaporkan di Turki, Prancis, Itali, Belgia dan Korea (khusus Korea, PER-1 berasal dari isolat *Acinetobacter*). PER-2 memiliki 86 % kesamaan dengan PER-1 dan ditemukan di *S. enteric* serovar *Typhimurium*.

2.5 Pemeriksaan Laboratorium *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL)

Metode deteksi ESBL secara umum dapat digolongkan ke dalam dua kelompok yaitu: metode fenotipik dengan menggunakan teknik non molekular, yang memiliki kemampuan deteksi enzim ESBL dalam menghidrolisis berbagai sefalosporin yang berbeda; dan metode genotipik dengan menggunakan teknik molekular yang mendeteksi gen *beta-lactamase*.

Rekomendasi Metode Deteksi ESBL menurut CLSI.⁴¹

Deteksi mikroorganisme penghasil ESBL sesuai rekomendasi CLSI yaitu berupa

2.5.1. Skrining dengan menggunakan metoda:

- Metode difusi cakram (*Disk diffusion method*)
- Uji kepekaan antibiotik metode dilusi (*dilution antimicrobial susceptibility tests*).

2.5.2. Tes konfirmasi fenotipik untuk produksi ESBL dengan :

- Kombinasi cakram sefalosporin/klavulanat
 - *Broth microdilution*.
 - *Quality control when performing screening and phenotypic confirmatory tests*.
 - *Implications of positive phenotypic confirmatory tests*
 - *False positives and false negatives obtained with phenotypic confirmatory tests*
- *Commercially Available Methods for ESBL Detection* berupa :
 - Etest untuk ESBLs.
 - Kartu ESBL Vitek.
 - Panel MicroScan
 - *BD Phoenix Automated Microbiology System*.

- Metoda lain untuk uji ESBL :
 - Kombinasi cakram Sefalosporin/klavulanat (*cephalosporine/ clavulanate combination disks*) pada agar Iso-Sensitest
 - Uji difusi cakram ganda (*Double-disk diffusion test*).
 - Agar yang disuplementasi dengan *klavulanat*.
 - Uji tiga dimensi (*Three-dimensional test*)

Clinical Laboratory Standar Internasional (CLSI) merekomendasikan metode difusi cakram dan metode dilusi sebagai tes penyaring untuk bakteri penghasil ESBL seperti *Klebsiella*, *E. coli*, dan *Proteus mirabilis*, dimana kecurigaan ESBL ditentukan berdasarkan perubahan zona diameter tertentu. Antibiotik yang digunakan adalah sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim, atau seftriakson. Jika salah satu diameter zona menunjukkan kecurigaan adanya produksi ESBL, maka harus dilakukan tes konfirmasi fenotipik. CLSI merekomendasikan zona diameter ≤ 22 mm untuk 10 ug cakram sefpodoksim sebagai tes penyaring untuk bakteri penghasil ESBL. Namun tes ini kurang spesifik untuk *E.coli*, oleh karena itu kini CLSI merekomendasikan batas uji penyaring dengan sefpodoksime adalah ≤ 17 mm. Uji *disk* sefpodoksim memiliki sensitivitas hampir 100%.⁴¹

CLSI juga merekomendasikan metode dilusi sebagai uji penyaring bakteri penghasil ESBL seperti *E. coli* dan *Klebsiella*. Antibiotik yang digunakan adalah seftazidim, aztreonam, sefotaksim, atau seftriakson dengan konsentrasi 1 ug/ml. Pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ini (konsentrasi hambat minimal (KHM) sefalosporin seftazidim, sefotaksim, seftriakson, azteronam) ≥ 2 ug/ml dan sefpodoksim ≥ 8 ug/ml) dapat dianggap sebagai penghasil ESBL. Jika bakteri diduga menghasilkan ESBL maka harus dilakukan uji konfirmasi fenotipik (*phenotypic conformation test*).²¹

Uji Konfirmasi Fenotipik ESBL

The Canadian External Quality Assessment Advisory Group for Antibiotic Resistance, The Indian Journal of Medical Microbiology, The British Society for Antimicrobial Chemotherapy dan CLSI merekomendasikan tes konfirmasi ESBL adalah tes konfirmasi fenotipik menggunakan cakram sefotaksim 30 ug atau seftazidim 30 ug dengan atau tanpa klavulanat 10 ug pada bakteri *Klebsiellae* dan *E. coli*.²¹ Cara membuat cakram ini yaitu larutan *asam klavulanat* ditambahkan pada cakram *sefalosporin*, kemudian diinkubasi selama 1 jam, setelah itu baru dapat digunakan. Tes ini dilakukan pada agar *Mueller Hinton*. Dikatakan konfirmasi fenotipik ESBL positif jika terjadi perbedaan diameter ≥ 5 mm antara disk sefalosporin tanpa klavulanat dengan cakram sefalosporin /klavulanat.²¹ Penting untuk menggunakan sefotaksim dan seftazidim dengan dan tanpa klavulanat dalam melakukan tes konfirmasi fenotipik. Salah satu alasannya adalah bahwa penggunaan seftazidim secara tunggal tidak mampu mendeteksi organisme penghasil CTX-M.⁴¹ Tes konfirmasi fenotipik juga dapat dilakukan dengan pemeriksaan mikrodilusi. Ada sebelas jenis fenotipik yang relevan dengan antibiotik *beta-lactam* diantara isolat *Enterobacteriaceae* yang dikenali oleh AES Vitek2, yaitu hiperproduksi SHV1, acquired penicillinase, tingkat tinggi sefalosporinase (AMPc), impermeabilitas carba (+ESBL OR+HL AMPc), ESBL, carbapenemase (+ OR – ESBL), ESBL (CTX-M Like), Acquired pase+case (AMPc), inhibitor resistant pase (IRT OR OXA), OXA-1 Like betalaktam, cephalosporinase (AMPc).

Vitek ESBL test

FDA (*Food and Drug Administration*) telah menyetujui sebuah kartu khusus yang ditujukan untuk mendeteksi bakteri penghasil ESBL. Tes vitek ESBL (bioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri) menggunakan sefotaksim dan seftazidim 0,5 ug/ml secara tunggal, serta kombinasi sefotaksim dengan asam klavulanat 4 ug /ml dan seftazidim dengan asam

klavulanat 4 ug /ml. Cara inokulasi kartu ini sama dengan cara yang dilakukan untuk kartu Vitek biasa. Analisis seluruh sumur dilakukan secara otomatis setelah pertumbuhan bakteri telah mencapai ambang batas yang telah ditetapkan (setelah inkubasi 4 – 15 jam). Hasil positif ditetapkan jika terjadi penurunan dalam pertumbuhan bakteri di sumur yang berisi sefotaksim atau seftazidim yang mengandung asam klavulanat, dibandingkan dengan pertumbuhan sumur yang mengandung sefalosporin saja. Sensitivitas dan spesifisitas metode ini dapat melebihi 90 %. Sanders dkk melaporkan sensitivitas metode ini dapat mencapai 99 %, namun sebaliknya Tzelepi dkk melaporkan bahwa metode ini dapat gagal mendeteksi ESBL yang dihasilkan oleh *Enterobacter species*. Keunggulan kartu ESBL Vitek adalah dapat digunakan / diintegrasikan ke dalam alur kerja laboratorium yang sudah menggunakan sistem Vitek.

Teknologi terbaru dari uji fenotipik dengan Vitek adalah Vitek2 *compact*, merupakan alat otomatis untuk identifikasi dan tes kepekaan untuk bakteri dan jamur yang memiliki software khusus dalam menentukan fenotip dari mekanisme resistensi. Sistem pemeriksaan otomatis menggunakan seperangkat computer dan reagen uji berbentuk kaset atau kartu dengan prinsip kalorimetri. Vitek2 *compact* dengan menggunakan kartu GN. Uji ESBL untuk bakteri dan dilakukan dengan alat Vitek2 *compact* menggunakan kartu AST-GN93. Kartu Vitek2 *compact* ini memiliki 6 sumur yang berisi sefepim dengan konsentrasi 1,0µg/ml, seftriakson 0,5µg/ml, seftazidim 0,5µg /ml, kombinasi sefepim/asam klavulanat 1,0/10µg/ml, seftriakson/asam klavulanat 0,5/4µg/ml, seftazidim/asam klavulanat 0,5/4µg/ml. Pertumbuhan bakteri di masing-masing sumur dinilai secara kuantitatif dengan pelacak optikal. Proporsi penurunan pertumbuhan bakteri dengan adanya sefalosporin saja dibandingkan dengan kombinasi sefalosporin dengan asam klavulanat menunjukkan produksi ESBL. Identifikasi dan uji resistensi antibiotik juga dilakukan dengan menggunakan alat Vitek2 *compact*. Jenis antibiotik yang diujikan

adalah ampisilin, ampisilin/sulbaktam, piperasilin/tazobactam, sefazolin, seftriakson, seftazidim, sefepim, aztreonam, meropenem, ertapenem, gentamisin, amikasin, ciprofloksasin, tigesiklin, trimetoprim/sulfametoksazol, dan nitrofurantoin. Tingkat keakuratan Vitek2 compact (bioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri) untuk identifikasi family *Enterobacteriaceae* adalah 90% dan sensitifitasnya 95,9% dalam mendeteksi ESBL. Selain identifikasi dan deteksi ESBL, Vitek2 dapat mendeteksi 100% genotype ESBL jenis CTX-M-1, 97% jenis CTX-M-9 dan 92% jenis SHV.

Pola genetik yang dihasilkan berdasarkan pola resistensinya terhadap antibiotik dapat diketahui dari keluaran hasil berupa kadar hambat minimal (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*). MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang terlihat setelah semalam diinkubasi. MIC digunakan oleh laboratorium diagnostik, terutama untuk konsentrasi antibakteri namun paling sering sebagai alat riset untuk menentukan aktivitas in-vitro antimikroba baru, dan data dari studi tersebut telah digunakan untuk menentukan *MIC breakpoints*.

Nilai MIC adalah spesifik untuk tiap-tiap kombinasi dari antibiotika dan mikroba. MIC dari sebuah antibiotika terhadap mikroba digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari mikroba terhadap antibiotika. Nilai MIC berlawanan dengan sensitivitas mikroba yang diuji. Semakin rendah nilai MIC dari sebuah antibiotika, sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. MIC dari sebuah antibiotika terhadap spesies mikroba adalah rata-rata MIC terhadap seluruh strain dari spesies tersebut. Strain dari beberapa spesies mikroba bisa sangat berbeda dalam hal sensitivitasnya. Faktor yang mempengaruhi MIC adalah medium, aditif, pH, konten ion, waktu inkubasi, suhu, dan atmosfer. Untuk itu perlu dilakukan standarisasi pada uji MIC. Banyak cara untuk pengujian sensitifitas menggunakan metoda breakpoint yang membagi bakteri ke dalam tiga kategori kerentanan

yaitu sensitif, intermediate dan resisten. Dalam beberapa teknik pengujian sensitifitas contohnya dengan menggunakan metoda breakpoint, dimana konsentrasi breakpoint yang dimasukkan dalam media padat atau cair, sehingga dalam pengujiannya hanya diperlukan dua tabung / plat sumur *microdilution*. Tidak ada pertumbuhan baik pada konsentrasi rendah maupun tinggi menunjukkan bahwa organisme sensitif, pertumbuhan pada konsentrasi yang lebih rendah tetapi tidak lebih tinggi menunjukkan sensitifitas jenis intermediet, dan tampak pertumbuhan pada kedua konsentrasi ditafsirkan sebagai resistensi. Metode breakpoint lebih sulit untuk dikendalikan daripada penentuan MIC penuh atau menggunakan metode difusi agar, karena nilai MIC untuk strain kontrol sering tidak dekat dengan konsentrasi yang diuji. Oleh karena itu kontrol mungkin gagal mendeteksi perubahan signifikan dalam konsentrasi uji.

Metode difusi disk adalah metoda yang serbaguna, ekonomis dan tetap menjadi pendekatan yang paling banyak digunakan untuk pengujian sensitifitas rutin di banyak negara. Metode Kirby-Bauer adalah dasar rekomendasi dari CLSI di AS, dengan Mueller-Hinton agar sebagai satu-satunya media yang disetujui dari inokulum pertumbuhan konfluen. Pengukuran uji sensitifitas adalah dengan melihat diameter zona inhibisi pertumbuhan yang terbentuk selama inkubasi dalam agar yang akan menjadi ukuran sensitifitas bakteri terhadap antibiotik. Diameter zona hambat secara umum berkorelasi dengan MIC melalui analisis regresi yang dilakukan pada MIC paralel, dan hasil uji difusi disk yang diperoleh dari koleksi isolat dengan berbagai sensitifitas. MIC breakpoints kemudian berubah menjadi breakpoints diameter zona hambat yang sesuai melalui garis regresi.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ukuran zona penghambatan dan harus dikontrol adalah :

- a. Konsentrasi mikroba pada permukaan medium. Semakin tinggi konsentrasi mikroba maka zona penghambatan akan semakin kecil.
- b. Kedalaman medium pada cawan petri. Semakin tebal medium pada cawan petri maka zona penghambatan akan semakin kecil.
- c. Nilai pH dari medium. Beberapa antibiotika bekerja dengan baik pada kondisi asam dan beberapa basa kondisi alkali/basa.
- d. Kondisi aerob/anaerob. Beberapa antibakterial kerja terbaiknya pada kondisi aerob dan yang lainnya pada kondisi aerob.

Pemeriksaan Molekuler

Lebih dari 800 jenis beta-laktamase telah ditemukan, sehingga para ahli mulai merancang dan mengimplementasikan protokol molekuler untuk mendeteksi gen *beta-lactamase*. Saat ini tes PCR telah tersedia dan dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri penghasil ESBL.

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan pemeriksaan teknik molekuler secara genotipik yang paling dapat diandalkan untuk identifikasi dan konfirmasi ESBL. Metode ini memiliki peran yang signifikan dalam laboratorium mikrobiologi klinis serta penting dalam pemilihan terapi.¹⁷ Macam tipe dan modifikasi PCR adalah *real time* PCR, RT-PCR, *nested* PCR, multiplex-PCR, dan PCR-ELISA.

Tahap – tahap PCR yakni: ^{1,2}

a. Denaturasi

Selama proses denaturasi, *double stranded* DNA akan membuka menjadi *single stranded* DNA. Hal ini karena suhu tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa nitrogen yang komplemen. Tahap ini berlangsung sekitar 1 hingga 2 menit. Seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90 °C – 95 °C.

b. Penempelan primer

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template selama 1-2 menit. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C – 60°C. Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72 °C.

c. Reaksi polimerisasi (*extension*)

Reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantaiterjadi pada suhu 72 °C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan *template* oleh DNA polimerase. Durasi tahap ini biasanya 1 menit.

Komponen PCR

Ada beberapa macam komponen utamanya dalam proses PCR, yaitu antara lain:²

1. *DNA template* (cetakan)

DNA template, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan/diamplifikasi. Fungsi *DNA template* di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama.

2. *Oligonukleotida primer*

Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (biasanya 20 – 30 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Primer merupakan basa komplementer dengan urutan basa pada ujung daerah yang akan diamplifikasi. Diperlukan sepasang primer untuk tiap amplifikasi untai DNA, yaitu primer sense (untuk sintesis untai DNA yang berorientasi 5 → 3) dan antisense (untuk sintesis untai DNA yang berorientasi 3 → 5).

3. Enzim Taq *polymerase*

Taq DNA polymerase tersusun atas satu rantai polipeptida dengan berat molekul kurang lebih 95 kD. Kelebihan enzim Taq DNA polimerase adalah bahwa enzim ini tahan terhadap suhu tinggi yang diperlukan untuk memisahkan rantai DNA cetakan.

4. dNTP (*Deoksiribonukleotida trifosfat*)

Shanghai Shine Gene Molekuler Biotech, Inc. (2009) menyatakan bahwa campuran dNTP adalah larutan air pada pH 7,0 yang mengandung dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Larutan dNTP merupakan bahan dasar pembuatan nukleotida.

5. *PCR buffer dan konsentrasi Mg²⁺*

Larutan Buffer yaitu bahan-bahan kimia untuk mengkondisikan reaksi agar berjalan optimum dan menstabilkan DNA polymerase.

Buffer berfungsi untuk menjamin pH medium, membantu menstabilisasi enzim polimerase DNA, mempengaruhi kerja enzim, dan atau DNA melting temperature (T_m).

Multiplex PCR merupakan salah satu pemeriksaan molekuler dengan menggunakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan amplicon dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuens DNA yang berbeda. Dengan penargetan beberapa gen sekaligus, informasi tambahan dapat diperoleh dari sekali uji tunggal yang tidak akan membutuhkan beberapa kali reagen dan lebih banyak waktu untuk melakukan. Temperatur *annealing* untuk masing-masing set primer harus dioptimalkan untuk bekerja dengan benar dalam reaksi tunggal, dan ukuran amplicon. Artinya, panjangnya pasangan basa harus berbeda cukup untuk membentuk band yang berbeda ketika divisualisasikan dengan elektroforesis gel.

Metode prosedur diagnostik molekuler salah satunya adalah hibridisasi yaitu kemampuan dua untai asam nukleat yang memiliki urutan basa komplementer yang

homolog untuk berikatan secara khusus satu sama lain dan membentuk molekul beruntai ganda, atau *duplex* atau *hybrid*.

2.6. Hybrispot24

Definisi

Hybrispot2424 merupakan suatu sistem hibridisasi DNA Flow otomatis untuk 24 sampel dengan teknologi *Sepsis Flow Chip* (SFC), yang sepenuhnya dipandu oleh perangkat lunak *hybriSoft*.^{1,2} Alat ini terautomatisasi secara penuh, menggunakan sinar UV untuk dekontaminasi DNA, mendiagnosis secara sensitif dan cepat, dilengkapi dengan ruang reaksi termostatik yang mampu memproses 1-24 sampel sekali jalan dengan durasi 30-120 menit. SFC merupakan sebuah perangkat diagnostik *in vitro* untuk infeksi nosokomial berdasarkan multipleks PCR dan hibridisasi *reverse dot blot* untuk mendeteksi secara simultan bakteri, jamur, dan gen resistensi antibiotik utama dalam uji tunggal. SFC memungkinkan deteksi lebih dari 36 spesies bakteri secara simultan (Coagulase-Negatif Staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, spesies *Enterobacteriaceae*, dan *Proteus spp.*), Spesies jamur (*Candida albicans* dan *Candida spp.*) dan dua puluh penanda resistensi antibiotik. Mengenai penanda resistensi antibiotik, kit ini mendeteksi satu gen untuk resistensi metisilin (*mecA*), dua gen untuk resistensi vankomisin (*vanA* dan *vanB*), dua untuk resistensi antibiotik *beta-lactam* (*blaSHV*, *blaCTXM*), dan lima belas gen untuk resistensi karbapenem (*kpc*) , *sme*, *nmc* / *imi*, *ges*, *vim*, *gim*, *spm*, *ndm*, *sim*, *imp*, *oxa23_like*, *oxa24_like*, *oxa48_like*, *oxa51_like*, dan *oxa58_like*). Metode ini didasarkan pada amplifikasi DNA target dengan dua PCR-multipleks dan kemudian hibridisasi amplicon yang terbiotinilasi ke probe DNA spesifik.¹

Keuntungan menggunakan alat ini diantaranya adalah :

1. Tidak perlu untuk melakukan ekstraksi DNA secara terpisah karena langkah tersebut telah menjadi satu dalam alat.
2. Hasil akan didapatkan dalam waktu 4 jam
3. Dapat dilakukan hanya dengan 1 sampel tanpa mempengaruhi biaya
4. Mudah untuk diinterpretasikannya
5. Sensitifitas dan spesifisitasnya tinggi
6. *Cost effective*

Cara Kerja Alat

Prosedur operasional alat ini meliputi tiga hal utama yaitu: Reaksi *multiplex-PCR*, persiapan reagen hibridisasi, dan *Flow-through reverse hybridization*. *Sepsis Flow Chip* (SFC) didasarkan pada metode yang melibatkan amplifikasi simultan dari setidaknya 36 spesies bakteri dan spesies jamur ditambah dua puluh penanda resistensi oleh *multiplex-PCR*, diikuti dengan hibridisasi *reverse dot blot* ke probe DNA spesifik yang digerakkan ke membran nilon, yang berdasarkan Teknologi DNA-Flow.¹ Platform DNA-Flow otomatis pada Hybrispot24 24 (HS24) memungkinkan pengikatan DNA amplifikasi pada probe penangkap dalam lingkungan berpori tiga dimensi, yang mampu menggabungkan produk PCR dan probe spesifiknya dengan sangat cepat. Produk-produk PCR yang terbiotinilasi di-hibridisasi dengan probe spesifik dan sinyal hibridisasi dikembangkan oleh reaksi imunoenzimatis kolorimetrik. Sinyal positif divisualisasikan melalui reaksi *immunoenzymatic* kolorimetri (Streptavidin-Alkaline Phosphatase dan kromogen NBT-BCIP) dalam membran chip oleh platform hibridisasi Hybrispot24 (HS24). Platform hibridisasi HS24 memiliki kamera *built-in* yang menangkap gambar chip dan kemudian dianalisis dalam platform oleh perangkat lunak hybrisoft yang mengidentifikasi pola titik yang muncul pada membran. Setiap pola titik dikaitkan dengan mikroorganisme dan

penentu resistensi genetik dan perangkat lunak hybrisoft memberikan hasil kepada pengguna.^{1,2,3}

Gen resistensi antimikroba yang terdeteksi oleh SFC dikonfirmasi oleh amplifikasi PCR, menggunakan primer spesifik untuk *blaSHV*, kelompok *blaCTX-M-1*, kelompok *blaCTX-M-9*, *blaGES-like*, *blaKPC-like*, *blaNDM-like*, *blaNMC-like* / *IMI-like*, *blaOXA-23-like*, *blaOXA-48-like*, *blaOXA-51-like* dan *blaVIM-like*. Amplikon *blaSHV* dicerna dengan enzim restriksi *NheI*, untuk membedakan antara gen penyandi non-ESBL dan ESBL-*blaSHV*.³

Sensitivitas dan Spesifitas

Carlos et al, telah melakukan penelitian mengenai evaluasi SFC untuk mengidentifikasi basil gram negatif dan gen resisten antibiotik secara langsung dari kultur darah positif. Dalam penelitiannya sebanyak 100 kultur darah positif, terdeteksi selama penelitian. Dari hasil tersebut dilakukan uji laboratorium rutin dan SFC didapatkan 90 kultur monomikroba dan 10 kultur polimikroba. Di antara kultur darah monomikroba (90), kesesuaian antara identifikasi SFC dan metode referensi (MALDI-TOF MS, *Microscan after subculture*) adalah 94,4%; namun mencapai 100% ketika SFC dikombinasikan dengan MALDI-TOF MS setelah inkubasi 4 jam. Pada kultur darah polimikroba (10), 15 dari 22 bakteri yang ada (68,2%) diidentifikasi dengan benar. Sebaliknya hanya satu bakteri yang diidentifikasi oleh MALDI-TOF pada masing-masing kultur darah polimikroba, sehingga kinerja SFC relatif lebih baik.³

Dalam studi lain, dilakukan penelitian pada kultur darah positif dari 202 pasien bakteremia yang dianalisis dengan uji SFC dan hasilnya dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh metodologi *gold standar* yang digunakan dalam laboratorium diagnostik mikrobiologi klinis (pedoman EUCAST). Pada uji SFC, secara keseluruhan sensitivitas

dan spesifisitas untuk identifikasi bakteri masing-masing adalah 93,3% dan 100%, khusus untuk bakteri gram negatif SFC mendeteksi 98% strain bakteri (55/56) dengan faktor penentu resistensi genetik. Sensitivitas dan spesifisitas untuk identifikasi penentu resistensi genetik antibiotik masing-masing adalah 93,6% dan 100%. Mengenai resistensi antibiotik pada isolat Gram-negatifnya, peneliti menggunakan *cefotaxime E-test* yang dikombinasikan dengan inhibitor kelas A, B, atau D *beta-lactamase*, sebagai metode diagnosis mikrobiologis standar yang mendeteksi adanya 11 isolat resisten sefotaksim, 9 diantaranya positif untuk produksi ESBL dan telah dikonfirmasi dengan pendekatan molekuler. Uji SFC mendeteksi 9 sampel dengan faktor penentu resistensi genetik yang dapat menjelaskan sensitivitas SFC sebesar 81% dalam mendeteksi isolat resisten sefotaksim.²

Table 2. Sensitivity and specificity of SFC assay in bacterial identification from positive blood culture samples.

Organisms isolated from positive blood cultures	No. of isolates	No. of blood culture correctly identified	Not detected	SFC result	Sensitivity	IC95%	Specificity	IC95%
Gram-positive Bacteria								
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	13		<i>S. aureus</i>	100	71–100	100	97–100
Other <i>Staphylococcus spp.</i>	70	70		<i>Staphylococcus sp.</i>	100	93–100	100	97–100
<i>Enterococcus spp.</i>	14	14		<i>Enterococcus sp.</i>	100	73–100	100	97–100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9	9		<i>S. pneumoniae</i>	100	63–100	100	98–100
Other <i>Streptococcus spp.</i>	8	6	2	<i>Streptococcus sp.</i>	75	35–95	100	97–100
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1		<i>L. monocytogenes</i>	75	35–95	100	97–100
Gram-negative Bacteria								
<i>Escherichia coli</i>	56	56		<i>E. coli</i>	100	92–100	100	97–100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	15		<i>K. pneumoniae</i>	100	74–100	100	97–100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	3	2	Enterobacteriaceae	60	17–92	100	97–100
<i>Serratia marcescens</i>	3	3		<i>S. marcescens</i>	100	31–100	100	98–100
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	4	2	Enterobacteriaceae	66	24–94	100	98–100
<i>Morganella morganii</i>	1	1		<i>M. morganii</i>	100	5–100	100	98–100
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3		<i>Proteus sp.</i>	100	31–100	100	98–100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	4		<i>P. aeruginosa</i>	100	40–100	100	98–100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	3		<i>A. baumannii</i>	100	31–100	100	98–100
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	3		<i>S. maltophilia</i>	100	31–100	100	98–100
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1		Enterobacteriaceae	100	5–100	100	98–100
Fungi								
<i>Candida albicans</i>	5	5		<i>C. albicans</i>	100	46–100		97–100
<i>Candida parapsilosis</i>	1	0	1	Negative	-			-
Not Included								
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	-	1	Negative				
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	-	1	Negative				
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	-	1	Negative				
<i>Pseudomonas putida</i>	1	-	1	Negative				
Total isolates	225	214	11					

Sensitivity and Specificity and 95% Confidence interval of SFC assay.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177627.t002>

Table 3. Sensitivity and specificity of SFC assay in detection of genetic resistance determinants from positive blood culture samples.

Drug resistant organisms	No. of isolates	No. of blood culture correctly identified	Not detected	SFC result	Sensitivity (%)	IC95%	Specificity (%)	IC95%
Gram-positive Bacteria								
MRSA ^a	2	2		(2) <i>mecA</i>	100	18–100	100	98–100
MRCoNS ^b	50	50		(50) <i>mecA</i>	100	91–100	100	97–100
VRE ^c	0	-		-	-	-	-	-
Gram-negative Bacteria								
ESBL ^d producers	11	9	(2) <i>blaAmpC</i>	(7) <i>blaCTX-M</i> , (2) <i>blaSHV</i>	81	47–97	100	98–100
Carbapenemase producers	0	-		-	-	-	-	-

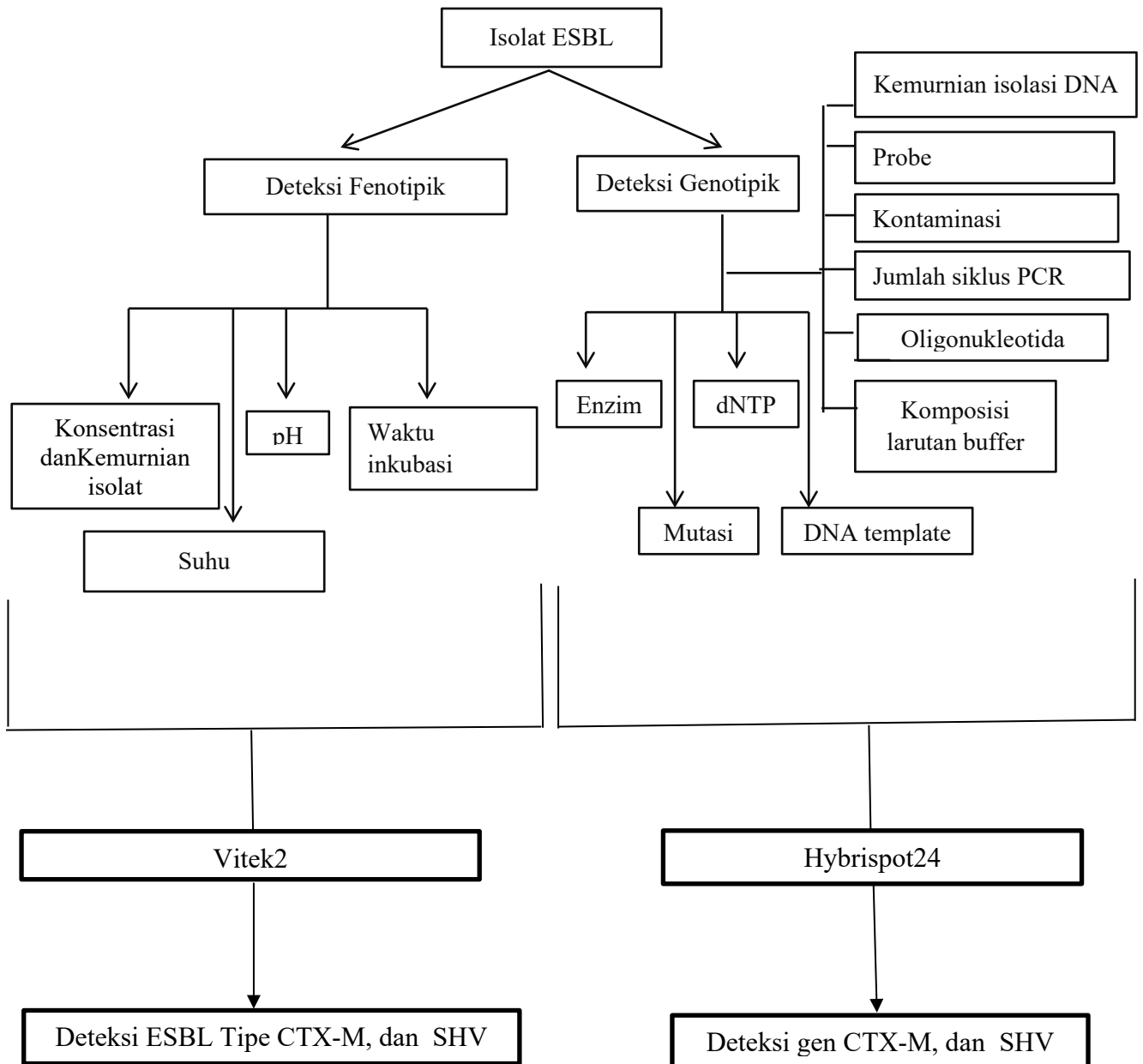
^a Methicillin Resistant *S. aureus*.^b Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci.^c Vancomycin Resistant Enterococci.^d Extended Spectrum β -Lactamase.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177627.t003>

Penanda resistensi utama yang terkait dengan resistensi sefotaksim yang diidentifikasi oleh uji SFC adalah *blaCTX*, (diidentifikasi dalam 4 kultur darah, 1 mengandung *E. coli*, dan 3 mengandung *K. pneumonia*), diikuti oleh *blaSHV* yang diidentifikasi dalam 2 kultur darah yang melindungi *E. coli*. Hanya 2 kultur darah yang mengandung *E. coli* dan diidentifikasi sebagai isolat resisten sefotaksim yang kompatibel dengan kelebihan produksi *blaAmpC* oleh protokol diagnostik mikrobiologis standar dan tidak terdeteksi oleh uji SFC karena penentu resistensi antibiotik ini (*blaAmpC*) tidak termasuk dalam panel uji SFC. Dengan demikian bisa dikatakan SFC mendeteksi dengan benar 100% strain produsen ESBL yang membawa *blaCTX-M* dan / atau *blaSHV*.²

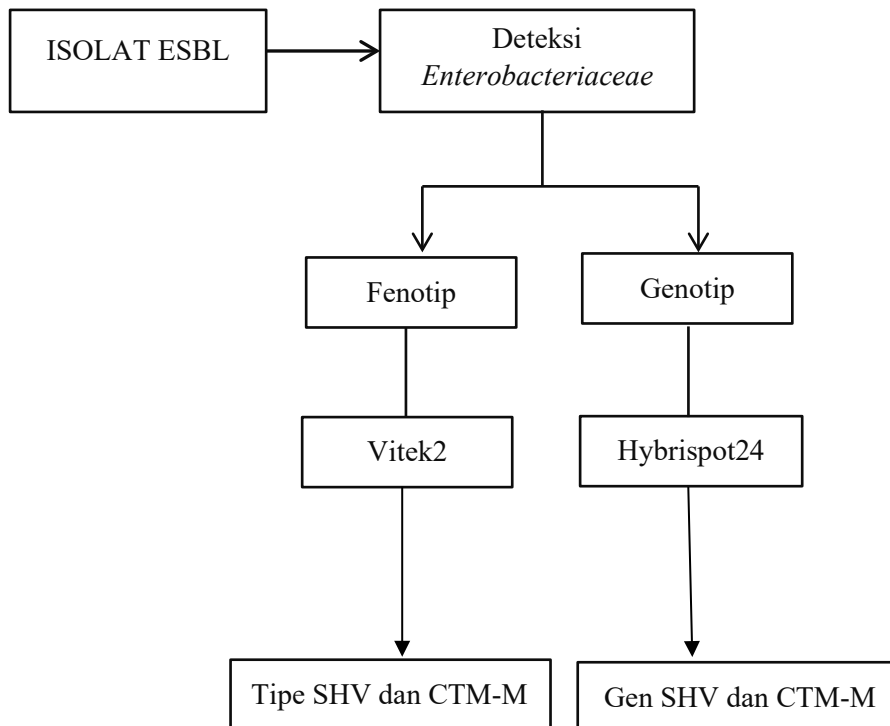
Sejalan dengan penelitian tersebut, Carlos et all menyebutkan bahwa sehubungan dengan gen resistensi antimikroba dengan uji SFC, yang paling umum ditemukan adalah *blaSHV*, diidentifikasi pada 18/100 kultur darah, dimana 14 gen berhubungan dengan non-ESBL-*blaSHV* dan empat gen ESBL-*blaSHV*. *blaCTX-M* terdeteksi pada 11/100 kultur darah, delapan diantaranya milik kelompok *blaCTX-M-9* dan tiga di kelompok *blaCTX-M-1*. Sedangkan deteksi *blaCTX-M*, *blaOXA-48* dan *blaVIM* masing-masing memperoleh 98,8%, 98,9% dan 99% dibandingkan dengan amplifikasi PCR. Uji SFC memberikan hasil hanya dalam empat jam dan menunjukkan tingkat kesesuaian tinggi dengan MALDI-TOF MS.³

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

2.7 Kerangka Teori



2.8 Kerangka Konsep



2.9 Hipotesis

Vitek2 dan Hybrispot24 tidak berbeda bermakna dalam kemampuan mendeteksi tipe ESBL jenis SHV dan CTX-M dari isolat *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL pada isolat klinis pasien.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini melingkupi bidang Mikrobiologi Klinik dan Infeksi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Dr. Kariadi Semarang dan Laboratorium RS UI Jakarta.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Mei 2019 - Juli 2019, dengan menggunakan isolat *Enterobacteriaceae* dari pasien RSUP Dr. Kariadi pada 1 Mei 2019 – 31 Juli 2019.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik dengan desain uji *aggrement*.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah isolat *Enterobacteriaceae* ESBL (+) (berdasarkan Vitek2) penyebab infeksi pada pasien rawat inap di RS Dr. Kariadi Semarang.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak tereksklusi dari kriteria yang ditetapkan.

Kriteria Inklusi

Isolat *Enterobacteriaceae* ESBL (+) penyebab infeksi pada pasien yang dirawat inap di RSUP Dr. Kariadi pada 1 Desember 2018 – 28 Februari 2019.

Kriteria Eksklusi

- Hasil eror dari pemeriksaan Vitek2
- Terdapat dua isolat bakteri dalam pemeriksaan

Besar Sampel Penelitian

Besar sampel minimal yang dibutuhkan ditentukan dengan menggunakan rumus umum deskriptif kategorik, yaitu

$$n' = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2}$$

Lalu Menggunakan Rumus :

$$N = \frac{n'}{P}$$

dimana:

n' = Jumlah subjek yang positif berdasarkan pemeriksaan referensi

N = besar subjek yang didiagnosis positif oleh *Vitek2 compact*

P = Sensitifitas alat yang diinginkan, yaitu 96%

Q = (1-Sensitifitas) = 1-0,96 = 0,04

d = presisi penelitian, yaitu 8%

$Z\alpha$ = deviat baku alpha, yaitu 1,96 dengan tingkat kesalahan 5%

P = proporsi penyakit, yaitu 0,79

$$n' = \frac{(1,96)^2 0,96(1-0,96)}{(0,08)^2}$$

$$n' = 23,048438$$

$$\text{Jumlah sampel} = \frac{23,048438}{0,79} = 29,175$$

Sehingga jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 29

Pada penelitian ini akan dilakukan pada 30 sampel.

Cara pengambilan Sampel

Pemilihan sampel penelitian adalah secara *consecutive sampling* yaitu menetapkan sampel yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan sebagai subjek penelitian sampai jumlah sampel terpenuhi.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel Prediktor

Variabel prediktor dalam penelitian ini adalah proses pemeriksaan menggunakan Vitek2 dan Hybrispot24 untuk deteksi gen *bla*CTX-M, dan *bla*SHV pada *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL.

Variabel Hasil Akhir atau Outcome

Variabel hasil akhir dalam penelitian ini kesesuaian dengan menggunakan analisis dari cohen kappa untuk identifikasi tipe ESBL *bla*SHV dan *bla*CTX-M dari Vitek2 terhadap baku emas Hybrispot24

3.6 Definisi Operasional

No	Variabel	Deskripsi	Skala
1	Vitek2	Alat otomatis untuk identifikasi dan tes kepekaan untuk bakteri dan jamur yang memiliki software khusus dalam menentukan fenotip dari mekanisme resistensi. Sistem pemeriksaan otomatis menggunakan seperangkat computer dan reagen uji berbentuk kaset atau kartu dengan prinsip kalorimetri.	Nominal
2	Hybrispot24	merupakan sistem hibridisasi DNA Otomatis yang sepenuhnya dikendalikan oleh software hybriSoft Berdasarkan metode Hibridisasi Teknologi DNA: Reverse dot-blot	Nominal

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat Vitek compact dengan menggunakan kartu GN. Uji ESBL untuk bakteri dan dilakukan dengan alat Vitek2 compact menggunakan kartu AST-GN93. Kartu Vitek compact ini memiliki 6 sumur yang berisi sefepim dengan konsentrasi 1,0 μ g/ml, seftriakson 0,5 μ g/ml, seftazidim 0,5 μ g /ml, kombinasi sefepim/asam klavulanat 1,0/10 μ g/ml, seftriakson/asam klavulanat 0,5/4 μ g/ml, seftazidim/asam klavulanat 0,5/4 μ g/ml. Pertumbuhan bakteri di masing-masing sumur dinilai secara kuantitatif dengan pelacak optikal. Proporsi penurunan pertumbuhan bakteri dengan adanya sefalosporin saja dibandingkan dengan kombinasi sefalosporin dengan asam klavulanat menunjukkan produksi ESBL. Identifikasi dan uji resistensi antibiotik juga dilakukan dengan menggunakan alat Vitek2 compact. Jenis antibiotik yang diujikan adalah ampisilin, ampisilin/sulbaktam, piperasilin/tazobactam, sefazolin, seftriakson, seftazidim, sefepim, aztreonam, meropenem, ertapenem, gentamisin, amikasin, ciprofloksasin, tigesiklin, trimetoprim/sulfametoksazol, dan nitrofurantoin. Pola genetik yang dihasilkan berdasarkan pola resistensinya terhadap antibiotik.

Hybrispot24 merupakan sistem hibridisasi DNA Otomatis yang sepenuhnya dikendalikan oleh software hybriSoft berdasarkan metode Hibridisasi Teknologi DNA: Reverse dot-blot. Sampel dimasukkan ke dalam alat, secara otomatis alat akan mengambil gambar dan menganalisis hasil.

Alat ini bekerja berdasarkan multiplex PCR dan *microarray chip* dengan menggunakan 1-24 sampel per run dalam waktu 30-120 menit. Mekanisme kerja dengan alat ini dimulai dari sampel klinik yang diproses dengan menggunakan

multiplek PCR, kemudian proses hibridisasi dengan HS24 dan terakhir keluar hasil. Keuntungan menggunakan alat ini diantaranya adalah :

1. Tidak perlu untuk melakukan ekstraksi DNA karena langkah tersebut telah menjadi satu.
2. Hasil akan didapatkan dalam waktu 4 jam
3. Dapat dilakukan hanya dengan 1 sampel tanpa mempengaruhi biaya
4. Mudah untuk diinterpretasikannya
5. Sensitifitas dan spesifisitasnya tinggi
6. *Cost effective*

Salah satu chip yang digunakan untuk identifikasi bakteri dan gen resisten pada antibiotik adalah sepsis flow chip (SFC) yang dapat mendeteksi 40 patogen bakteri termasuk bakteri Gram positif dan negative, jamur dan 20 gen resisten antibiotik yaitu MRSA, mecA, vanA, vanB, ESBL dan gen karbapenemase.

Pengumpulan dan Pengolahan Data

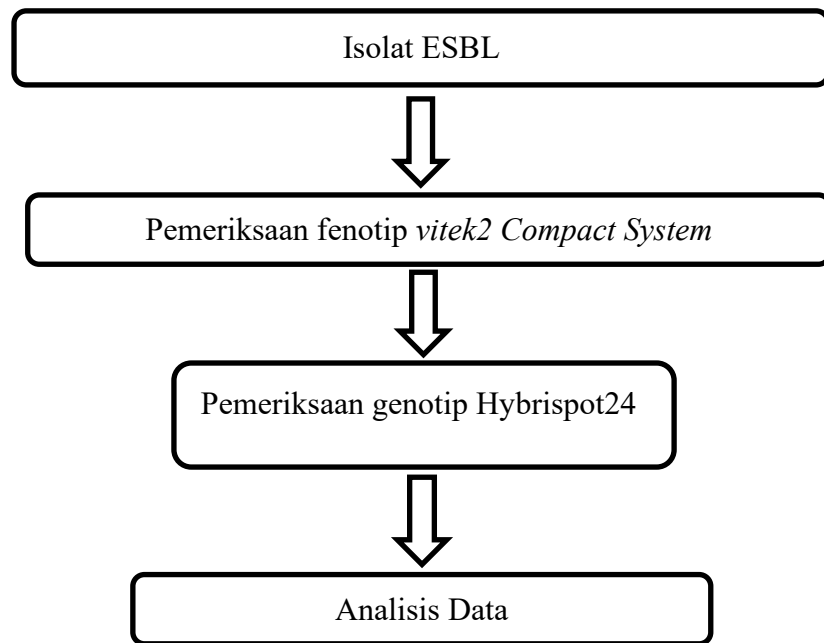
Pengumpulan Isolat diambil dari hasil kultur, kemudian dilakukan pemeriksaan identifikasi dan tes kepekaan antibiotik menggunakan Vitek-2 Compact System (Biomerieux.USA) dan Hybrispot24.

Pada penelitian ini digunakan jenis penelitian khusus, yaitu penelitian kesesuaian (*aggrement*). Keluaran yang dihasilkan adalah berupa kesesuaian dari metode diagnostik yang diuji.

3.7.2 Bahan

Isolat diambil dari hasil kultur murni, kemudian dilakukan pemeriksaan identifikasi dan tes kepekaan antibiotik menggunakan *Vitek-2 Compact System* (Biomerieux.USA) dan Hybrispot24.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilaksanakan prosedur penelitian akan diminta persetujuan Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr Kariadi Semarang dan izin penelitian kepada Direktur RSUP Dr. Kariadi Semarang. Data pribadi pasien akan ditanggung kerahasiaannya dan kepentingan pasien tetap diutamakan.

3.10 Analisis Data

Data yang didapat dari kedua macam pemeriksaan (Vitek2 dan Hybrispot24) berupa data nominal. Kemudian akan dilakukan pengelompokan berdasarkan tabel 2x2 sebagai berikut :

Koefisien Cohen's Kappa digunakan untuk mengukur kererataan dari 2 variabel pada tabel kontingensi yang diukur pada kategori yang sama atau untuk mengetahui tingkat kesepakatan dari 2 alat uji dalam menilai.

Pengukuran tingkat kesepakatan antar penilai (inter-rater reliability) digunakan koefisien

Cohen's Kappa sebagai berikut:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Keterangan:

K = Koefisien Cohen Kappa

P_o = Proporsi Kesepakatan teramati

P_e = Proporsi kesepakatan harapan

1 = Konstanta

Dengan patokan kekuatan

Kesepakatan < 0 sangat jelek, 0,00-0,21 jelek, 0,21-0,40 kurang, 0,41-0,60 sedang, 0,61-0,80 baik, 0,81-1,00 sangat baik. Nilai Kappa yang dapat diandalkan untuk dipakai adalah antara 0,61-1,00.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dari bulan April 2019 sampai dengan Juni 2019 di RSUP Dr. Kariadi Semarang dan RSUI Jakarta, pada isolat klinis sejumlah 30 yang berasal dari sampel urine, darah, sputum, swab dasar luka, dan cairan efusi. Sampel ditumbuhkan pada media Mc Conckey dan Blood Agar selama 18-24 jam. Isolat yang tumbuh diambil untuk dideteksi jenis spesies dan pola resistensinya dengan mesin Vitek2, apabila hasil termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL kemudian dilakukan uji molekuler dengan menggunakan Hybrispot24, untuk melihat kesesuaian antara kedua alat tersebut dalam mendeteksi tipe ESBL jenis SHV dan CTX-M. Uji molekuler dilakukan di RSUI.

Pada penelitian ini terdapat satu sampel yang dieksklusi yaitu sampel yang berasal dari sputum. Saat uji dengan Vitek2 dapat diambil satu koloni isolat yang terpisah, dan hasil identifikasinya adalah *K.pneumonia* ESBL dengan ketepatan 99% sesuai dengan tipe fenotipik. Saat isolat ditumbuhkan kembali untuk dilakukan pemeriksaan uji dengan Hybrispot24, ternyata teridentifikasi 2 spesies yang berbeda, yaitu *Klebsiella pneumoniae* dan *Acinetobacter baumannii* serta 2 gen resisten *blaSHV* dan *blaCTX-M*. Uji yang dilakukan tidak dapat menentukan spesies mana yang membawa gen tersebut, sehingga sampel dieksklusi.

4.1 Deteksi Tipe ESBL oleh Vitek2

Tabel 4.1. Distribusi Sampel dan Spesies Bakteri dan Tipe ESBL Berdasarkan Vitek2

Sampel	<i>E.coli</i>			<i>K.Pneumonia</i>		
	CTX-M	SHV	Tipe ESBL Hasil Teridentifikasi	CTX-M	SHV	Tipe ESBL Hasil Teridentifikasi
Urin	0	0	10	0	1	2
Sputum	2	0	1	1	1	2
Darah	0	0	4	0	0	0
Pus	0	0	3	0	0	0
Cairan efusi	0	0	0	0	0	1
Swab luka	0	0	0	0	0	1
Jumlah	2	0	18	1	2	6

Dari tabel 4.1 dapat diketahui bahwa dari 29 isolat yang teridentifikasi, 20 adalah *E.coli* dan 9 isolat adalah *K.pneumonia*. Hasil uji dengan Vitek2 untuk tipe ESBL banyak yang tidak terdeteksi, hanya 5 dari 29 dapat teridentifikasi tipe ESBL nya oleh Vitek2 yaitu 3 tipe CTX-M, 2 tipe SHV. Jumlah tipe ESBL tidak dapat dideteksi oleh Vitek2 pada 24 dari 29 isolat yang diperiksa (83%).

4.2 Deteksi tipe ESBL oleh Hybrispot24

Tabel 4.2. Distribusi Sampel dan Spesies Bakteri dan Tipe ESBL Berdasarkan Hybrispot24

Sampel	<i>E.coli</i>			<i>K.pneumonia</i>		
	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> CTX-M <i>bla</i> SHV	<i>bla</i> CTX-M <i>bla</i> GES	GENlain	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> SHV- <i>bla</i> CTM
Urin	8	1	0	1	1	2
Sputum	3	0	0	0	1	3
Darah	3	0	1	0	0	0
Pus	1	0	1	1	0	0
Cairun efusi	0	0	0	0	0	1
Swab luka	0	0	0	0	0	1
Jumlah	15	1	2	2	2	7

Dari tabel 4.2. dapat dilihat bahwa Hybrispot24 dapat mengidentifikasi spesies *E.coli* dan *K.pneumonia* sama dengan hasil dari Vitek2. Adapun dalam identifikasi tipe ESBL, Hybrispot24 dapat mengidentifikasi lebih banyak yaitu 27 dari 29 isolat (93%). Tipe ESBL terbanyak dari hasil penelitian ini adalah *bla*CTX-M yang dideteksi melalui keberadaan *bla*CTX-M, yang terdapat pada 18 isolat *E.coli* dan 7 isolat *K.pneumonia*. ESBL tipe SHV dideteksi Hybrispot24 melalui keberadaan gen *bla*SHV pada 10 bakteri, yaitu 9 isolat *K.pneumonia*, dan 1 isolat *E.coli*. Hybrispot24 dapat mendeteksi keberadaan bersama tipe ESBL *bla*CTX-M dan *bla*SHV pada 8 isolat, yaitu 7 isolat *K.pneumonia* dan 1 isolat *E.coli*. Gen *bla*SHV tunggal ditemukan pada 2 bakteri *K. pneumonia*.

Selain gen *bla*SHV dan *bla*CTX-M, Hybrispot24 mampu mendeteksi gen resistensi lainnya yang tidak terdeteksi oleh Vitek2, yaitu gen *carbapenemase bla*GES. Gen tersebut dibawa oleh 2 isolat *E.coli* yang teridentifikasi pula memiliki gen *bla*CTX-M. Hasil uji sensitivitas antibiotik dari kedua isolat tersebut oleh Vitek2 didapatkan masih sensitif terhadap meropenem dengan nilai MIC $\leq 0,25$.

Tabel 4.3. Perbandingan Deteksi ESBL Tipe CTX-M dan SHV oleh Vitek2 dan Hybrispot24

Tipe ESBL	Vitek2		Hybrispot24	
	Terdeteksi	Tidak Terdeteksi	Terdeteksi	Tidak Terdeteksi
CTX-M	3	13	15	0
SHV	2	0	2	0
CTX-M SHV	0	8	8	0
CTX-M GES	0	2	2	0
Gen lain	0	2	0	2
Jumlah	5	25	27	2

Tabel 4.3 menjelaskan ESBL tipe *bla*CTX-M terdeteksi oleh Hybrispot24 pada 25 dari 29 isolat penghasil ESBL. Tiga ESBL tipe CTX-M oleh Vitek2, dideteksi pula oleh Hybrispot24, 2 berupa gen tunggal dan 1 merupakan gen gabungan antara *bla*CTX-M dengan *bla*SHV. Dua ESBL tipe SHV yang dideteksi oleh Vitek2, juga dideteksi oleh Hybrispot24 yaitu sebagai gen tunggal.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa Hybrispot24 dapat mendeteksi dalam lebih satu gen resistensi. Adapun Vitek2 hanya dapat mendeteksi keberadaan 1 tipe ESBL dan tidak dapat mendeteksi dua tipe ESBL bersamaan dari 1 isolat. Dalam penelitian terdapat dua isolat penghasil ESBL yang tidak dapat dideteksi tipenya baik oleh Vitek2 maupun Hybrispot24.

Tabel 4.4. Hasil Uji Kappa ESBL Deteksi Tipe SHV oleh Vitek2 dan Gen SHV dari Hybrispot24

SHV Vitek2	<i>blaSHV</i> Hybrispot24				Total		κ
	Terdeteksi		Tidak terdeteksi		n	%	
	n	%	N	%			
Terdeteksi	2	6,9	0	0	2	6,9	0,247
Tidak terdeteksi	8	27,6	19	65,5	27	93,1	
Jumlah	10	34,5	19	65,5	29	100	

Vitek2 mampu mendeteksi ESBL tipe SHV sejumlah 2 dari 10 isolat pembawa gen tersebut, sedangkan Hybrispot24 mampu mendeteksi keseluruhan ESBL tipe *blaSHV*. Hasil uji Kappa didapatkan nilai $\kappa = 24,7\%$, kategori kesesuaian “kurang”. Semua ESBL tipe SHV yang dideteksi oleh Vitek2 dapat dideteksi oleh Hybrispot24.

Tabel 4.5. Hasil Uji Kappa Deteksi ESBL tipe CTX-M dari Vitek2 dan *blaCTX-M* oleh Hybrispot24

CTX-M Vitek2	<i>blaCTX-M</i> Hybrispot24				Total		κ
	Terdeteksi		Tidak terdeteksi		n	%	
	N	%	n	%			
Terdeteksi	3	10,3	0	0	3	10,3	0,036
Tidak terdeteksi	22	75,9	4	13,8	26	89,7	
Jumlah	25	86,2	4	13,8	29	100	

Dari tabel diatas didapatkan bahwa Vitek2 mampu mendeteksi ESBL tipe CTX-M pada 3 dari 25 isolat pembawa gen tersebut, sedangkan Hybrispot24 mampu mendeteksi tipe *blaCTX-M* dari kesemua (25) isolat pembawa gen tersebut. Hasil uji kappa didapatkan nilai $\kappa = 3,6\%$ yang berarti tingkat kesesuaian termasuk dalam kategori buruk. Semua ESBL tipe CTX-M yang dideteksi oleh Vitek2 dapat dideteksi gennya oleh Hybrispot24.

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi karakteristik enzim ESBL tipe SHV dan CTX-M pada *Enterobacteriaceae* yang diisolasi dari pasien rawat inap di RSUP Dr. Kariadi Semarang, serta mengukur kesesuaian hasil pemeriksaan Vitek2 (deteksi secara fenotipik) dan Hybrispot24 (deteksi secara genotip) dalam mendeteksi tipe ESBL.

5.1 Karakteristik Tipe ESBL dan Gen Penghasil Enzim ESBL di RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Vitek2 mendeteksi tipe enzim ESBL CTX-M dan SHV secara fenotipik, yaitu berdasarkan pola MIC yang khas dari berbagai antibiotik yang diuji, khususnya sefepim, seftriakson, seftazidime secara tunggal dan kombinasi dengan asam klavulanat sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh CLSI yang kemudian dianalisis oleh program *advance expert system* (AES) dari mesin Vitek2. Hybrispot24 mendeteksi tipe enzim ESBL CTX-M dan SHV berdasarkan keberadaan gen *bla*CTX-M dan *bla*SHV. Alat ini bekerja berdasarkan multipleks PCR dan hibridisasi dengan pembacaan akhir menggunakan *microarray chip*, sehingga dapat mendeteksi polimikroba dan *multiple gene* yang didapatkan dalam isolat sampel.¹⁶ Chip yang digunakan untuk penelitian ini adalah *sepsis flow chip* (SFC) yang dapat mendeteksi 40 patogen bakteri termasuk bakteri Gram positif dan negatif, jamur dan 20 gen resistensi antibiotik seperti *blamecA*, *blavanA*, *blavanB*, gen resistensi pembawa ESBL (*bla*SHV dan *bla*CTX-M) dan gen *carbapenemase*.^{16,37}

Karakteristik gen yang didapatkan dari penelitian ini adalah *bla*CTX-M (52%), *bla*SHV (7%), kombinasi *bla*SHV dan *bla*CTX-M (27%), dan kombinasi *bla*CTX-M dan *bla* GES (7%) dan gen lainnya (7%). Gen *bla*CTX-M adalah gen terbanyak yang sebesar

86% dan gen kedua terbanyak adalah *blaSHV* sejumlah 34%. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang mengidentifikasi, sebanyak 27 dari 30 isolat *E. coli* (90%) positif mengandung gen *blaCTX-M*.¹⁹ Penelitian lain yang sama dengan hasil penelitian ini adalah penelitian AMRIN yang menyebutkan bahwa Indonesia adalah negara berkembang yang dipengaruhi oleh muncul dan menyebarnya strain *E coli* yang membawa gen ESBL jenis *blaCTX-M-15*.¹⁹

Dalam penelitian ini didapatkan Vitek2 hanya mampu mendeteksi 17% tipe ESBL jenis CTX-M dan 7% ESBL tipe SHV, angka ini sangat rendah jika dibandingkan dengan penelitian Woori J, et al yang mendeteksi tipe ESBL jenis CTX-M 96% dan 92% untuk ESBL tipe SHV serta penelitian Caroline et al yang menyatakan bahwa Vitek2 dapat mendeteksi keberadaan enzim CTX-M. Rendahnya kemampuan deteksi tipe enzim ESBL CTX-M dan SHV pada penelitian ini terutama terjadi pada isolat yang memiliki lebih dari satu gen penyandi resistensi, kemungkinan karena kedua gen diekspresikan sehingga kedua enzim bersifat aktif dan menghasilkan pola MIC yang berbeda dari pola MIC untuk tipe CTX-M dan SHV yang dikenali Vitek2. Kemungkinan lain, salah satu gen penyandi enzim tidak diekspresikan karena gen enzim yang lainnya bersifat repressor, sehingga salah satu enzim tidak diproduksi dan tidak terdeteksi oleh Vitek2. Keberadaan enzim juga tidak dapat dideteksi oleh Vitek2 bila ekspresi gen penyandi enzim tersebut bersifat *inducible*, sehingga walaupun ada gen pengatur, promotor, dan operator terlibat, tetapi gen tidak ditranslasikan dan enzim tidak diproduksi apabila tidak ada molekul *inducer* seperti laktosa atau antibiotik yang sesuai.⁴⁵ Menurut Patterson DI, satu organisme yang sama dapat memiliki 2 gen ESBL *blaCTX-M* dan *blaSHV* atau ESBL *blaCTX-M* dan tipe lainnya, hal ini yang dapat mengubah fenotipik antibiotik resistensi.^{3,42} Dengan kemampuan deteksi tipe enzim ESBL demikian dapat dikatakan Vitek2 gagal mendeteksi karakteristik tipe enzim ESBL jenis CTX-M dan SHV di RSUP Dr Kariadi, antara lain

karena banyak isolat yang memiliki gen resistensi lebih dari satu Banyaknya isolat yang memiliki gen resistensi ini mungkin merupakan implikasi bahwa transmisi gen resistensi di lingkungan perawatan RSDK sangat tinggi, sehingga RSDK perlu meningkatkan kembali upaya pencegahan transmisi melalui Pencegahan dan Pengendalian Infeksi (PPI).

Selain faktor *inherent* Vitek diatas, faktor lain yang bersifat eksternal juga dapat menyebabkan kegagalan Vitek2 dalam mendeteksi tipe ESBL enzim CTX-M dan SHV, yaitu kurang tepatnya kadar pengenceran yang menyebabkan MIC menjadi lebih rendah atau lebih tinggi dari seharusnya (*very major error*) sehingga pola MIC tidak dikenali oleh Vitek2. Ini berarti Laboratorium Mikrobiologi harus melakukan penjaminan kualitas yang lebih ketat dengan memastikan kepatuhan teknisi laboratorium untuk melakukan pemeriksaan sampel dengan standar yang tinggi.

Berkebalikan dengan Vitek2, Hybrispot24 dapat mendeteksi 100% gen *bla*CTX-M dan *bla*SHV. Selain itu Hybrispot24 dalam penelitian ini juga dapat mendeteksi gen resistensi lain yaitu *bla*GES, yang merupakan enzim yang menghidrolisis antibiotik golongan *carbapenem*. Ini sesuai dengan penelitian lain yang mendapatkan bahwa Hybrispot24 juga mampu mendeteksi beberapa gen resistensi dari satu isolat yang sama.^{26,28}

Gen ESBL terletak pada plasmid yang dapat dengan mudah ditransfer diantara dan didalam spesies bakteri.^{2,9} Beberapa gen ESBL adalah turunan mutan dari *beta-lactamase* yang dimediasi-plasmid (mis.,*bla*TEM / *bla*SHV), dan lainnya dimobilisasi dari bakteri lingkungan (mis.,*bla*CTX-M).^{28,23} Selama tahun 1990-an, sebagian besar laporan tentang gen ESBL berkaitan dengan jenis *bla*TEM / *bla*SHV, yang terkait dengan infeksi silang di rumah sakit. Namun, dari penelitian secara global baru-baru ini sebagai besar gen pembawa ESBL adalah gen tipe *bla*CTX-M.^{3,23,28}

Epidemiologi gen ESBL berubah dengan cepat dan menunjukkan perbedaan geografis yang nyata dalam distribusi genotipe *bla*CTX-M *beta-lactamase*.⁵ Di Amerika Serikat, gen resistensi terhadap antibiotik yang paling umum pada manusia saat ini adalah *bla*CTX-M-15, yang sering dikaitkan dengan varian *Escherichia coli* O: 25b, tipe strain 131 (ST131) yang tersebar luas. Bakteri yang mengandung gen ESBL saat ini merupakan penyebab umum infeksi yang berasal dari komunitas tanpa riwayat rawat inap, dan organisme ini kemudian menyebar di rumah sakit.⁹

Gen *bla*CTX-M adalah gen terbanyak yang ditemukan saat ini, gen ini termasuk dalam kelompok A berdasarkan pembagian dari Bush and Jacob Medeiros yang memiliki aktivitas hidrolitik kuat terhadap sefotaksim dibandingkan terhadap oxyimino-beta-lactam lainnya, seperti seftazidim, seftriakson atau sefepime.³⁶ Gen *bla*SHV adalah gen terbanyak kedua setelah *bla*CTX-M pada penelitian ini. Menarik untuk dicatat bahwa semua isolat *K.pneumonia* dalam penelitian kami membawa gen *bla*SHV, sementara hanya 1 isolat *E.coli* yang membawa gen tersebut. Selain itu, sebagian besar *bla*SHV 27% berada bersama gen lain.²⁹ Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian dari Woori J, et all dan Tabbaaouche S, et all yang menyebutkan bahwa *bla*SHV banyak didapatkan pada bakteri *K.pneumonia* dan merupakan gen gabungan dengan gen resistensi lainnya.²⁹ ESBL tipe SHV dengan ciri menghidrolisis sefotaksim lebih besar dibandingkan seftazidime.

Gen lain yang terdeteksi pada penelitian ini adalah *carbapenemase* GES yang muncul bersama CTX-M yang dibawa oleh bakteri *E coli*. Hasil uji secara fenotipik pada dua sampel tersebut dengan menggunakan Vitek2 masih sensitif terhadap golongan antibiotik *carbapenem* dengan MIC $\leq 0,25$. Data ini perlu menjadi perhatian khusus karena implikasinya sangat besar pada pelayanan pasien dan pada pengendalian resistensi antimikroba di rumah sakit. Dengan data MIC yang sangat rendah tersebut maka klinisi akan memilih meropenem sebagai terapi antibiotik pada pasien ini, padahal strain tersebut

sebenarnya resisten terhadap karbapenem. Dapat diduga pasien tersebut kemungkinan besar mengalami kegagalan terapi antibiotic.

5.2 Kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam Mendeteksi Tipe ESBL SHV dan CTX-M

Hasil uji kesesuaian antara kedua alat tersebut dalam deteksi ESBL tipe SHV didapatkan koefisien $K=0,247$, termasuk dalam kategori kesesuaian kurang Hasil uji kesesuaian untuk ESBL tipe CTX-M didapatkan $K=0,036$, termasuk dalam kategori sangat kurang (buruk), padahal peneliti lain menunjukkan tingkat kesesuaian antara hasil pemeriksaan dengan Vitek2 dan Hybrispot yang jauh lebih tinggi.²⁹ Rendahnya tingkat kesesuaian ini mungkin spesifik di RSDK, atau di RS lain yang sekelas, berkaitan dengan banyaknya strain yang memiliki lebih dari satu gen resistensi. Faktor lain ketidaksesuaian adalah riwayat penggunaan antibiotik yang berbeda antar individu yang dapat mempengaruhi sensitifitas yang terkait dengan MIC dari antibiotik tersebut. Selain itu, kendali mutu mungkin juga merupakan faktor penyebab tingginya ketidaksesuaian, seperti kepatuhan teknisi laboraotrium mikrobiologi dalam melaksanakan prosedur pemeriksaan, kualitas reagen yang memerlukan validasi secara berkala, dan sebagainya.

5.3 Implikasi Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa implikasi penting, pertama adalah implikasi terapeutic. Pedoman penggunaan antibiotik di rumah sakit perlu ditinjau ulang karena karakteristik gen berkaitan dengan terapi antibiotik.²⁸ Penelitian ini menunjukkan bahwa 86% isolat memiliki gen *bla*CTX-M, yang berarti mampu menghidrolisis sefotaksim. Organisme yang memproduksi *beta-lactamase* tipe CTX-M biasanya memiliki MIC cefotaxime dalam kisaran resisten (64 g/ml), sedangkan MIC ceftazidime biasanya dalam

kisaran yang tampak sensitif (2 hingga 8 g / ml).³⁶ Namun, beberapa ESBL tipe CTX-M sebenarnya dapat juga menghidrolisis ceftazidime dan menyebabkan resistensi terhadap seftazidim dengan MIC sampai 256 g/ml). Bahkan beberapa jenis CTX-M juga dapat menghidrolisis cefepime dengan efisiensi tinggi, dengan MIC cefepime lebih tinggi dari bakteri yang memproduksi jenis ESBL lainnya.^{35,37} Tazobactam adalah *beta-lactamase* inhibitor yang dapat memiliki aktivitas penghambatan hampir 10 kali lipat lebih besar daripada asam klavulanat terhadap enzim jenis CTX-M.^{3,38} Hasil penelitian yang sama juga menyebutkan bahwa hanya (23,3%) isolat bakteri pembawa gen ESBL yang sensitif terhadap asam klavulanat yang dikombinasikan dengan antibiotik amoksisilin atau tikarsilin.²⁰ Persentase kepekaan bakteri antibiotik meningkat secara signifikan (82,2%) apabila *beta-lactamase* inhibitor tazobaktam dikombinasikan dengan antibiotik piperasilin.^{3,20} Dengan demikian sefotaksim seharusnya dihapus dari pedoman antibiotik di RS Dr. Kariadi, sedangkan seftazidim dan sefepim hendaknya digunakan dengan kewaspadaan tinggi, misalnya, secara sangat selektif dan segera pikirkan kemungkinan mengganti antibiotik apabila dalam 3-4 hari setelah mulai terapi tidak ada perbaikan. Selain itu, kombinasi amoksisilin-klavulanat juga perlu evaluasi ketat apabila digunakan pada pasien karena efektivitasnya terhadap *bla*CTX-M kurang kuat. Piperasilin-tazobaktam lebih diutamakan sebagai antibiotik terpilih pada infeksi karena ESBL penghasil CTX-M.

Implikasi kedua adalah pada diagnostik Di RS dengan banyak infeksi ESBL maka pemeriksaan genotipik pada bakteri penghasil ESBLs sangat diperlukan, karena tipe gen penghasil ESBLs yang berbeda membutuhkan terapi antibiotik yang berbeda pula. Selain itu, *beta-lactamase* inhibitor tertentu hanya efektif untuk menetralkan tipe enzim ESBL tertentu.^{3,20} Gen *bla*SHV-2, *bla*TEM-3, *bla*CTX-M-15 menghidrolisis oxyimino-sefalosporin dan monobaktam, tetapi dapat dihambat oleh asam klavulanat sehingga

kombinasi dengan klavulanat dapat menjadi pilihan. Sedangkan *bla*TEM-30, *bla*SHV-10 resisten terhadap asam klavulanat, tazobaktam dan sulbaktam. Jenis enzim yang berbeda akan memberi konsekuensi yang berbeda dalam pemberian terapi.^{15,37}

Tidak terdeteksinya jenis enzim resistensi bisa membawa akibat sangat serius, seperti pada 2 isolat dalam penelitian ini yang ternyata membawa gen *bla*GES yang menyandi enzim *carbapenemase*, padahal MIC pada pemeriksaan fenotipik untuk meropenem dan ertapenem sangat rendah ($\leq 0,25$). Tanpa adanya informasi genetik maka pasien dengan hasil uji kepekaan seperti ini akan diterapi dengan meropenem, dan berakhir dengan kegagalan terapi karena bakteri menghasilkan enzim *carbapenemase*.

Agar informasi tentang jenis enzim ini muncul dengan akurat, maka pemeriksaan genotipik dengan PCR multipleks menjadi sangat dibutuhkan, mengingat banyak isolat memiliki lebih dari satu gen resistensi. Pemilihan jenis alat ini menjadi krusial karena efektivitas alat sangat tergantung pada pola dan distribusi enzim ESBL di suatu rumah sakit. Hybrisspot24 sebagai alat diagnostik deteksi gen mungkin tepat digunakan di RS Kariadi karena kebetulan sebagian besar tipe ESBL adalah *bla*CTX-M dan *bla*SHV yang ada dalam panel pemeriksaan *sepsis flowchart* Hybrisspot24. Akan tetapi bila pola epidemiologi bergeser dengan adanya peningkatan proporsi tipe enzim yang lain, atau di rumah sakit lain dengan tipe enzim yang berbeda yang tidak ada dalam panel pemeriksaannya, maka alat tersebut menjadi kurang berguna. Ini berarti surveilans tipe enzim juga perlu dilakukan, dan produsen alat diagnostik secara genotipik juga perlu selalu meng-update jenis panel pemeriksaan diagnostiknya. Alternatif lain adalah pemeriksaan dengan alat lain seperti MALDITOFF, Microscan, dsb. Apapun alat yang dipilih, harus selalu dievaluasi kemampuannya dalam mendeteksi tipe enzim secara terjadwal.

Di sisi lain, Vitek2 sebenarnya mampu mendiagnosis lebih banyak tipe ESBL selain CTX-M dan SHV, misalnya OXA, AmpC dan sebagainya. Akan tetapi akurasi sangat tergantung pada ketepatan pengenceran suspensi kuman yang dimasukkan ke dalam alat Vitek2 dan faktor teknis lain. Oleh karena itu, Laboratorium Mikrobiologi harus lebih ketat dalam menjalankan penjaminan mutu pemeriksaan yang dilakukan oleh analisnya, agar MIC yang dihasilkan akurat dan dapat dikenali oleh AES Vitek2 sebagai dasar diagnosis tipe enzim. Analis dan dokter Sp.MK perlu lebih jeli dalam menganalisis hasil pemeriksaan Vitek2, tidak sekedar berapa % ketepatan identifikasi spesiesnya, melainkan juga apakah MIC nya tepat, yang hanya bisa diketahui melalui uji validasi internal secara rutin menggunakan strain ATCC.

Pemeriksaan genotipik dan fenotipik memiliki kepentingan yang besar bagi klinisi. Pemeriksaan genotipik digunakan sebagai bentuk uji resistensi antibiotik (*antibiotic resistancy test/ ART*) yang diperlukan agar klinisi mengetahui antibiotik apa yang sebaiknya tidak digunakan, sedangkan uji sensitifitas antibiotik (*antibiotic susceptibility test/ AST*) diperlukan agar klinisi mengetahui antibiotik apa yang dapat digunakan. Pemeriksaan fenotipik tetap bermanfaat karena menyediakan uji kepekaan antibiotik dalam bentuk MIC yang tidak semuanya ada dalam pemeriksaan genotipik.

Implikasi ketiga adalah pada upaya pengendalian transmisi melalui PPI yang intensif dan efektif. Banyaknya isolat yang memiliki gen resistensi lebih dari satu mengimplikasikan adanya “lalu-lintas transmisi yang padat”. Isolasi kontak untuk pasien yang terinfeksi atau terkolonisasi oleh kuman penghasil ESBL harus dilaksanakan secara konsisten dan sesuai dengan standar minimal. Selain itu perlu dilakukan surveilans untuk mencari sumber transmisi, misalnya wastafel, tempat cuci alat, alat-alat medis, dan sebagainya.

Keterbatasan penelitian ini pertama adalah sampel yang hanya 29 buah. Walaupun secara statistik sudah memenuhi jumlah sampel minimal, tetapi dalam aplikasinya mungkin masih perlu tambahan data agar kesimpulan yang diperoleh lebih kuat, mengingat jenis enzim ESBL yang sangat banyak. Keterbatasan kedua adalah variasi spesies penghasil ESBL hanya *E. coli* dan *K. pneumoniae* yang mungkin belum dapat digeneralisasi untuk spesies penghasil ESBL lainnya. Ketiga, generalisasi luas dari temuan ini juga dibatasi oleh dominasi *bla*CTX-M-type ESBLs dalam sampel ini. Keempat, dalam penelitian ini peneliti tidak membuat langsung suspensi yang digunakan untuk uji resistensi dan identifikasi bakteri pada Vitek2, sehingga kadar pengenceran tidak dapat diketahui dengan pasti.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 SIMPULAN

1. Populasi ESBL di RS Dr. Kariadi didominasi oleh ESBL tipe *bla*CTX-M
2. Karakteristik gen penghasil ESBL pada pasien RS Dr. Kariadi adalah *bla*CTX-M, *bla*SHV, gabungan *bla*CTX-M dan *bla*SHV dan gabungan antara carbapanemase GES dan *bla*CTX-M.
3. Gen *bla*CTX-M banyak dibawa oleh bakteri *E.coli* dan gen *bla*SHV dibawa oleh bakteri *K. pneumoniae*.
4. Tidak ada kesesuaian antara Vitek2 dan Hybrispot24 dalam mendeteksi bakteri *Enterobacteriaceae* penghasil *bla*SHV dan *bla*CTX-M

6.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat karakteristik gen dengan pola sensitifitas antibiotik.
2. Penelitian dengan sampel yang lebih besar dirasa perlu untuk melihat keragaman jenis bakteri *Enterobacteriaceae* terkait dengan jenis gen dan sensitifitas antibiotik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Staf pengajar fakultas kedokteran universitas indonesia. buku ajar mikrobiologi kedokteran edisi revisi. jakarta: binarupa aksara, 1994.
2. B. E. Bali, L. Acik and N. Sultan, "Phenotypic and Molekuler characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended spectrum beta lactamases produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella* isolats in Turkish Hospital," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 8, no. 4, pp. 650-654, 2010.
3. T. Sana KR, B. Racha, D. Fouad, A. Marcel, M. Hasan, H. Sani and H. Monzer. Detection of genes TEM, OXA, SHV, and CTX-M in 73 clinical isolats of *Escherichia coli* producers of extended spectrum beta lactamases and determination of their suscepectibility to antibiotics. *iMedPub Journals* 2011; 1.
4. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):159–166. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0.
5. chamberlain NR. *The big Picture Medical Microbiology*. united states: Mc Graw Hill Lange, 2009.
6. Mangeney N, Niel P, Paul G, Faubert E, Hue S, Dupeyron C, Louarn F, Leluan G. A 5-year epidemiological study of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolats in a medium- and long-stay neurological unit. *J Appl Microbiol*. 2000;88:504–511. .
7. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):813–821. .
8. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostik Microbiology*, 12 ed. united states: Elsevier, 2009.
9. Jan N, Kulkarni A, Meshram SU. Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolatd from UTI patients of Nagpur City, India. *Romanian Biotechnological Letters* 2009;5
10. Kluytmans JA1 OI, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MF, van der Zwaluw K, Heck M, Rijnsburger M, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, Johnston BD, Gordon D, Johnson JR. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clinical Infectious Disease* 2013;4.
11. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Schapendonk C, van den Munckhof T, Leverstein-van Hall MA, et al. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolats from patients and poultry meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*. 2013; 167: 359±362.
12. Pajariu A. *Infeksi oleh Bakteri Penghasil Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) di RSUP Dr Kariadi Semarang : Faktor Risiko terkait Penggunaan Antibiotik*. Semarang: Universitas Diponegoro, 2010.
13. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1162–1171.
14. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003.

15. Munday C. J., Xiong J., Li C., Shen D., Hawkey P. Dissemination of CTX-M type β -lactamases in Enterobacteriaceae isolats in the people's republic of China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23, 175–180. .
16. Hawkey, P. M. 2008. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(Suppl. 1):159-165.
17. Vidhya Natarajan SSS. Prevelance of bla TEM gene in uropathogenic Escherichia coli isolatd from tertiary care hospitals in Coimbatore, SouthIndia. . *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013;Vol 5, , Suppl 3.
18. Karim MH, Md S, Alam D, Yeasmin T. Molekuler Identification of TEM and SHV Genes in Extended Spectrum Beta-lactamase Producing Escherichia coli and Klebsiellae pneumoniae Isolats in a Tertiary Care Hospital, Bangladesh. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2017; 11(2):1189-1198.
19. Severin JA1 LE, Kloezen W, Lemmens-den Toom N, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Purwanta M, Duerink DO, Hadi U, van Belkum A, Verbrugh HA, Goessens WH; “Antimicrobial Resistance in Indonesia, Prevalence and Prevention” (AMRIN) study group. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among humans in Java, Indonesia, in 2001-2002. *Trop Med Int Health* 2012 Apr;17(4):455-61.
20. Grover S. S, Sharma M, Chattopadhyaya D, Kapoor H, Pasha ST, Singh G. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated Sefalosporins resistance in Klebsiella pneumoniae:Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation Sefalosporins. *J Infect* 2006; 54: 279-88. .
21. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-86.
22. Colodner R, Raz R. Extended-spectrum beta-lactamases: the end of Sefalosporins? *Isr Med Assoc J* 2005;7:336-8.
23. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae: risk factors, molekuler epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:498-504.
24. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum -lactamases (ESBL) - an emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microbiol* 2004;22:75-80.
25. Canadian Committee on Antibiotic R. Antimicrobial resistance: An update from the Canadian Committee on Antibiotic Resistance. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005;16:309-11.
26. Dakh F; Mutation frequency of non-ESBL phenotype SENTRY(Asia-Pasific) Isolats of Klebsiella pneumonia Conversion to ESBL Positive Phenotype; Queensland University of Technology School of Life Science; QUT December 2008; downloaded at http://eprints.qut.edu.au/28413/1/Farshid_Dakh's_Thesis.pdf; 05.01-2010.
27. Taslima Y. Prevalence of ESBL among E. coli and Klabsiella Sp in a Tertiary Care Hospital and Molekuler Detection of Important ESBL Producing Genes by Multiplex PCR. Departement Microbiology and Immunology Mymensingh Medical College. Mymensingh Banglades 2012: 66-85.
28. Rani S, .I.Jahnavi, K.Nagamani. Phenotypic and Molekuler Characterization of ESBL producing Enterobacteriaceaein A Tertiary Care Hospital. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)* 2016;15:27-34.
29. Jang W, Park Y-J, Park KG, Yu J. Evaluation of MicroScan WalkAway and Vitek2 for determination of the susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolats to cefepime, sefotaksim and seftazidim. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(10):2282-5.

30. Biedenbach DJ BS, Hoban DJ, Hackel M, Phuong DM, Nga TT, Phuong NT, Phuong TT, Badal RE. Antimicrobial susceptibility and extended-spectrum beta-lactamase rates in aerobic gram-negative bacteria causing intra-abdominal infections in Vietnam: report from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART 2009-2011). *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 2014;79(4):463-7.
31. D'Angelo RG JJ, Bork JT, Heil EL. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. . *Expert Opinion Pharmacotherapy* 2016;17(7):953-67.
32. Chandra V and Goswami PN. Detection of TEM & SHV Genes In Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing E. Coli & Klebsiella Pneumoniae Isolatd From A Tertiary Care Cancer Hospital. *Natl J Med Res.*, 2014; 4(3): 201-04.
33. Saroj Kumar Sah et al /*Int.J. PharmTech Res.*2014-2015, 7(2), pp 303-309.
34. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J. *Medical Microbiology*. new york: Thieme publisher, 2005.
35. Livermore D.M. and Hawkey P.M., CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK, *J. Antimicrob.Chemothe.*, 2005, 56,3, 451–454.
36. Fam N., Leflon-Guibout V., Fouad S., Aboul-Fadl L., Marcon E., Desouky D., CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolats in Cairo (Egypt), including isolats of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings, *Microb. Drug. Resist.*, 2011, 17,6773.
37. Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson N.D., Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolats from Cairo, Egypt, *BMC Infect. Dis.*, 2009, 9, 84.
38. Bell J.M., Turnidge J.D., Gales A.C., Pfaller M.A. And Jones R.N., Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolats in the Asia-Pacific region and South Africa, *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, 42, 193–198.
39. Rossi F., Baquero F. and Hsueh, P.R., In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolatd from patients with intra-abdominal infections worldwide, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, 58, 205-210.
40. Ensor V.M., Shahid M., Evans J.T. and Hawkey P.M., Occurrence, prevalence and genetik environment of CTX-M beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* from Indian hospitals, *J. Antimicrob.Chemother.*, 2006, 58, 6, 1260-3.
41. Tenover FC, P. M. Raney, P. P. Williams, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, A. Oliver, S. K. Fridkin, L. Jevitt, and J. E. McGowan, Jr. Evaluation of the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolats collected during Project ICARE. *J. Clin. Microbiol.* 41:3142–3146. 2003.
42. Asensio Al OA, González-Diego P, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Cantón R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis.* 2000 Jan;30(1):55-60.
43. Ho PL1 CW, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(8):567-73.
44. Lee SO1 LE, Park SY, Kim SY, Seo YH, Cho YK. Reduced use of third-generation Sefalosporins decreases the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004 Oct;25(10):832-7.
45. Todar K. Regulation and Control of Metabolism in Bacteria. <http://textbookofbacteriology.net/regulation.html>

Frequencies

Frequency Table

Kuman Vitec

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	E Coli	20	69.0	69.0	69.0
	Klebsiella	9	31.0	31.0	100.0
	Total	29	100.0	100.0	

Kuman Hybrispot

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	E Coli	20	69.0	69.0	69.0
	Klebsiella	9	31.0	31.0	100.0
	Total	29	100.0	100.0	

SHV Vitec

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Terdeteksi	2	6.9	6.9	6.9
	Tidak terdeteksi	27	93.1	93.1	100.0
	Total	29	100.0	100.0	

SHV Hybris pot

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Terdeteksi	10	34.5	34.5	34.5
	Tidak terdeteksi	19	65.5	65.5	100.0
	Total	29	100.0	100.0	

CTX-M Vitec

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Terdeteksi	3	10.3	10.3	10.3
	Tidak terdeteksi	26	89.7	89.7	100.0
	Total	29	100.0	100.0	

CTX-M Hybris pot

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Terdeteksi	25	86.2	86.2	86.2
	Tidak terdeteksi	4	13.8	13.8	100.0
Total		29	100.0	100.0	

Crosstabs

SHV Vitec * SHV Hybris pot

Crosstab

			SHVHybris pot		Total
			Terdeteksi	Tidak terdeteksi	
SHVVitec	Terdeteksi	Count	2	0	2
		% of Total	6.9%	.0%	6.9%
	Tidak terdeteksi	Count	8	19	27
		% of Total	27.6%	65.5%	93.1%
Total		Count	10	19	29
		% of Total	34.5%	65.5%	100.0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.247	.149	2.020	.043
N of Valid Cases		29			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

CTX-M Vitec * CTX-M Hybrispot

Crosstab

			CTX-M Hybrispot		Total
			Terdeteksi	Tidak terdeteksi	
CTX-M Vitec	Terdeteksi	Count	3	0	3
		% of Total	10.3%	.0%	10.3%
	Tidak terdeteksi	Count	22	4	26
		% of Total	75.9%	13.8%	89.7%
Total		Count	25	4	29
		% of Total	86.2%	13.8%	100.0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.036	.027	.732	.464
N of Valid Cases		29			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabel deskriptif

Variabel	F	%
Kuman Vitec		
E Coli	20	69,0
Klebsiella	9	31,0
Kuman Hybrispot		
E Coli	20	69,0
Klebsiella	9	31,0
SHV Vitec		
Terdeteksi	2	6,9
Tidak terdeteksi	27	93,1
SHV Hybrispot		
Terdeteksi	10	34,5
Tidak terdeteksi	19	65,5
CTX-M Vitec		
Terdeteksi	3	10,3
Tidak terdeteksi	26	89,7
CTX-M Hybrispot		
Terdeteksi	25	86,2
Tidak terdeteksi	4	13,8

Tabel hasil uji kappa SHV

SHV Vitec	SHV Hybrispot				Total		κ
	Terdeteksi		Tidak terdeteksi		n	%	
	n	%	n	%			
Terdeteksi	2	6,9	0	0	2	6,9	0,247
Tidak terdeteksi	8	27,6	19	65,5	27	93,1	
Jumlah	10	34,5	19	65,5	29	100	

Hasil uji kappa didapatkan nilai $\kappa = 0,247 = 24,7\%$

Nilai $\kappa = 24,7\%$ masuk dalam kategori nilai kesesuaian yang buruk

Tabel hasil uji kappa CTX-M

CTX-M Vitec	CTX-M Hybrispot				Total		κ
	Terdeteksi		Tidak terdeteksi		n	%	
	n	%	n	%			
Terdeteksi	3	10,3	0	0	3	10,3	0,036
Tidak terdeteksi	22	75,9	4	13,8	26	89,7	
Jumlah	25	86,2	4	13,8	29	100	

Hasil uji kappa didapatkan nilai $\kappa = 0,036 = 3,6\%$

Nilai $\kappa = 3,6\%$ masuk dalam kategori nilai kesesuaian yang buruk