

## IDENTIFIKASI SECARA BIOMOLEKULER BAKTERI RESISTEN ANTIBIOTIK CEFIXIME DARI INDIVIDU PENGGUNA TUMPATAN GIGI AMALGAM

Ni Made Okayanti<sup>1)</sup>, Fatimawali<sup>1)</sup>, Trina E. Tallei<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

<sup>2)</sup>Jurusan Biologi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

### ABSTRACT

*Amalgam is a dental fillings which containing mercury ( $Hg^{2+}$ ). The presence of mercury in amalgam can induce the growth of mercury resistant bacteria and affect bacterial resistance to antibiotics, so that there may be a negative impact on urinary tract infection treatment (UTI) which can lead to the medication failure. The objective of the study was to identify mercury-resistant bacteria and antibiotic-resistant bacteria in amalgam dental users. This research is descriptive explorative. The urine sample taken from 1 participant of amalgam fillings user and 1 participant who did not use amalgam fillings. The isolate bacteria were identified using morphology, physiology and biochemistry tests and also test of antibiotic resistance againts Cefixime. Isolates of mercury resistant bacteria and antibiotic-resistant bacteria were identified bio molecularly with the 16S rRNA gene. The test results showed 2 bacterial isolates resistant to all test antibiotics. The isolates of antibiotic-resistant bacteria were tested in biomolecular identification and identified as *Klebsiella pneumoniae*.*

**Keywords :** *Amalgam, urine, antibiotic resistant bacteria, Cefixime, 16S rRNA gene, Klebsiella pneumoniae.*

### ABSTRAK

Amalgam merupakan tumpatan gigi yang mengandung merkuri ( $Hg^{2+}$ ). Adanya merkuri dalam amalgam dapat menginduksi tumbuhnya bakteri resisten merkuri dan mempengaruhi resistensi bakteri terhadap antibiotik, sehingga dapat timbul dampak negatif bagi pengobatan infeksi saluran kemih (ISK) yang berupa terjadinya kegagalan pengobatan. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi bakteri resisten merkuri dan resisten antibiotik pada pengguna tumpatan gigi amalgam. Penelitian ini bersifat deskriptif eksploratif. Sampel urin berasal dari 1 partisipan pengguna tumpatan gigi amalgam dan 1 partisipan yang tidak menggunakan tumpatan gigi amalgam. Isolat bakteri yang diperoleh diidentifikasi dengan uji morfologi, fisiologi dan biokimia selain itu dilakukan juga uji resistensi antibiotik ciprofloxacin, cefixime dan amoxicilin. Isolat bakteri resisten bakteri resisten antibiotik diidentifikasi secara biomolekuler dengan gen 16S rRNA. Hasil uji menunjukkan 2 isolat bakteri resisten semua antibiotik uji. Isolat bakteri tersebut diidentifikasi biomolekuler dan teridentifikasi sebagai bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

**Kata kunci :** *Amalgam, urin, bakteri resisten antibiotik, Cefixime, gen 16S rRNA, Klebsiella pneumoniae*

## **PENDAHULUAN**

Amalgam merupakan campuran logam yang terdiri atas 45-55% logam merkuri, sekitar 30% perak dan sisanya yaitu tembaga, timah dan seng (WHO, 2005). Penambalan gigi dengan menggunakan tumpatan amalgam telah dilakukan sejak lebih dari 160 tahun yang lalu. Sampai sekarang amalgam masih digunakan oleh dokter gigi karena merupakan bahan tumpatan yang kuat, tahan lama, harganya murah, dapat beradaptasi dengan baik dengan cairan mulut dan pengerjaannya hanya dalam satu kali kunjungan (Ranthore *et al.*, 2012).

Adanya merkuri di dalam tumpatan amalgam membuat penambalan gigi berlubang ini sangat banyak diteliti, mengingat efek toksik dari merkuri. Menurut (Silver and Phung, 2005) dalam Fatimawali (2013), bakteri yang resisten terhadap merkuri mempunyai kemampuan untuk menurunkan toksisitas atau dapat mendetoksifikasi merkuri melalui mekanisme enzimatik. Bakteri ini mampu untuk mereduksi ion  $Hg^{2+}$  menjadi  $Hg^0$  karena menghasilkan enzim merkuri reduktase. Hal ini diperkuat oleh penelitian Fatimawali (2013) yang mendapati adanya 3 isolat bakteri resisten merkuri dari urin pasien di Puskesmas Bahu yang menggunakan tumpatan amalgam. Ketiga isolat bakteri tersebut dapat menurunkan 100% kadar merkuri dalam media kaldu nutrisi.

Detoksifikasi merkuri oleh bakteri resisten merkuri terjadi karena bakteri tersebut memiliki gen *mer operon* (Dash and Das 2012). Apabila bakteri flora normal di urin yang resisten Hg juga resisten terhadap antibiotik, maka akan timbul dampak negatif bagi pengobatan infeksi saluran kemih (ISK) pada individu

dengan kondisi tersebut, yang berupa terjadinya kegagalan pengobatan.

Dengan berkembangnya identifikasi mikroorganisme maka saat ini identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan metode berbasis molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA. Identifikasi menggunakan analisis sekuens gen 16S rRNA dinilai memberikan hasil yang sangat akurat dan dapat dijadikan sebagai metode diagnosis dalam aplikasi klinis. Analisis ini dapat menjawab berbagai permasalahan yang berkaitan dengan identifikasi berbasis mikrobiologi konvensional, di antaranya yaitu dapat digunakan pada mikroorganisme yang tidak dapat dikultur serta menunjukkan hasil yang dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu yang secara fenotipik membingungkan atau belum pernah ditemukan sebelumnya (Clarridge, 2004; Kattar *et al.*, 2000)

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui resistensi bakteri pada urin individu dengan tumpatan amalgam terhadap antibiotik. Antibiotik yang dipilih yaitu Cefixime. Pemilihan antibiotik ini berkaitan dengan penggunaannya dalam pengobatan penyakit ISK. Selain itu, untuk mengetahui spesies bakteri resisten antibiotik tersebut, maka dilakukan analisis secara biokimiawi maupun molekuler terhadap gen 16S rRNA.

## **METODE PENELITIAN**

### **Waktu dan Tempat**

Penelitian dilakukan pada bulan November 2016 sampai dengan September 2017, di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

## Jenis Penelitian dan Pengambilan Sampel

Metode yang digunakan adalah metode deskriptif eksploratif. Sampel yang digunakan adalah bakteri dari urin partisipan yang telah bersedia. Satu sampel diambil dari urin partisipan yang memiliki tumpatan amalgam dan satu sampel urin lainnya diambil dari partisipan yang tidak memiliki tumpatan amalgam. Sampel bakteri diisolasi pada media *nutrient agar*. Sampel tersebut dimurnikan dan diidentifikasi secara morfologi, fisiologi dan biokimia kemudian diuji resistensinya terhadap antibiotik Cefixime.

## Alat

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Erlenmeyer (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), gelas kimia (*Pyrex*), tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, pipet mikro (CAPP), timbangan analitik (*aeADAM*<sup>®</sup>), batang pengaduk, cawan petri (*Pyrex*), jarum Öse, pinset, inkubator (*Incucell*), *laminar air flow* (*Biotek*), autoklaf (ALP), mikroskop (*Olympus*), *L-Glass*, penggaris berskala (*COMBO*<sup>®</sup>), kertas label, plastik pembungkus, *aluminium foil*, kapas, kasa, seperangkat alat PCR (*Biometra T-Personal*) dan elektroforesis (*Biometra T-Personal*), alat fotografi.

## Bahan

Sampel urin dari partisipan yang bersedia, akuades, alkohol, NaCl, *yeast ekstrak*, trypton, safranin, kristal violet, agar bakteriologi, *nutrient agar (NA)*, *nutrient broth (NB)*, *Simmo's Citrate Agar*, *triple sugar iron agar (TSIA)*, *lysine iron agar (LIA)*. Alkohol 70%, cakram antibiotik Cefixime. Kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), primer set untuk 16S rRNA bakteri, MyTaq HS Red Mix untuk amplifikasi DNA (Bioline), ddH<sub>2</sub>O, gel

agarosa, 1x TAE buffer, loading dye dan etidium bromida.

## Identifikasi Bakteri Secara Morfologi, Fisiologi dan Biokimia

Identifikasi morfologi bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram, fisiologi bakteri diuji dengan uji motilitas, sedangkan biokimia bakteri diuji dengan uji H<sub>2</sub>S, katalase, indol, *citrat*, fermentasi karbohidrat dan uji dekarboksilasi lisin.

## Uji Resistensi Terhadap Cefixime

Pengujian resistensi antibiotik dilakukan dengan beberapa tahap yaitu pembuatan larutan *Mc Farland*, suspensi bakteri uji, penanaman cakram serta pengukuran dan penetapan zona hambat.

## Isolasi DNA Genomik

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri dilakukan dengan metode *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid). Sampel kultur bakteri dibiakan terlebih dahulu pada media LB (*lysogeny broth*) cair.

## Amplifikasi gen 16S rRNA dengan Teknik PCR

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *combi block* (*whatman biometra Germany*). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer universal bact F1 (*forward*) dan uni B1 (*reverse*). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA genomik bakteri yang telah diisolasi.

## Elektroforesis dan Visualisasi

DNA yang telah diamplifikasi kemudian diseparasi dengan *elektroforesis gel agarosa* 1%. *Gel* direndam dalam campuran larutan TBE *buffer* dan etidium bromida. Visualisasi dilakukan dengan sinar UV pada UV-transiluminator.

## Sekuensing gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil

visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim data diatas ke 1<sup>st</sup> BASE Malaysia. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST melalui media Online NCBI, untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies bakteri resisten antibiotik Cefixime.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Isolasi Bakteri dari Urin**

Sampel urin diisolasi dari 2 orang partisipan usia dewasa yang bersedia. Satu orang partisipan menggunakan tumpatan gigi amalgam dan satu orang partisipan lainnya tidak menggunakan tumpatan amalgam. Partisipan diminta menampung urin porsi tengah pada pagi hari, dalam pot salep. Urin dari partisipan yang berbeda diencerkan sebanyak 7x agar supaya bakteri yang dihasilkan tidak terlalu pekat. Masing-masing suspensi bakteri diinokulasi ke dalam media *nutrient agar* (NA) *plate* untuk menumbuhkan bakteri yang akan digunakan untuk pengujian. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh pada media NA dengan cara digores zig-zag pada media NA yang lain. Hal ini dilakukan untuk memisahkan bakteri-bakteri agar mendapatkan isolat bakteri yang murni.

Dari hasil pemurnian ini didapatkan 19 isolat bakteri. Kode isolat -1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -10 untuk isolat bakteri yang berasal dari urin partisipan yang tidak menggunakan tumpatan amalgam. Kode isolat +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10 untuk isolat bakteri yang berasal dari urin partisipan yang menggunakan tumpatan amalgam.

Setelah dilakukan pemurniaan, bakteri yang tumbuh diinokulasi kembali ke media NA miring untuk dijadikan kultur stok. Isolat bakteri tersebut diregenerasi setiap 2 minggu sekali dengan cara yang sama agar supaya bakteri yang diinginkan tetap hidup.

**Uji Morfologi dan Fisiologi**

Tabel 1. Hasil Pengujian Morfologi dan Fisiologi

No	Uji Morfologi (Pewarnaan Gram)		Uji Fisiologi (Motilitas)
	Bentuk	Gram	
-1	Basil	-	+ (weak)
-2	Basil	-	+ (weak)
-3	Kokus	+	-
-4	Basil	-	-
-5	Kokus	+	-
-6	Basil	-	-
-8	Basil	+	+ (weak)
-9	Basil	-	-
-10	Basil	+	+ (weak)
+1	Basil	-	+
+2	Kokus	+	-
+3	Basil	-	+
+4	Basil	-	+
+5	Basil	-	-
+6	Kokus	-	+ (weak)
+7	Kokus	+	-
+8	Kokus	+	-
+9	Kokus	+	-
+10	Kokus	-	-

Ket :

Kode isolat bakteri dari urin partisipan tanpa amalgam : -1,-2,-3,-4,-5,-6,-8,-9,10

Kode isolat bakteri dari urin partisipan dengan amalgam : 1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8,+9,+10

Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Rostinawati, 2008). Bentuk bakteri ada 3 diantaranya yaitu

bulat (kokus), batang (basil) dan lengkung atau koma (spiral) (Harti, 2012), sementara

pada penelitian ini hanya ditemukan isolat bakteri berbentuk kokus dan basil.

**Uji Biokimia**

Tabel 2. Hasil Pengujian Biokimia

Kode Isolat	Katalase	Indol	Fermentasi Karbohidrat			H <sub>2</sub> S	Sitrat	Dekarboksilasi Lysin
			Glukosa	Laktosa/ Sukrosa	Gas			
-1	+	-	+	+	+	+	+	-
-2	+	-	+	+	+	+	+	-
-3	+	-	+	+	+	-	+	-
-4	+	-	+	-	-	+	+	-
-5	+	-	+	-	-	-	+	-
-6	+	-	+	+	+	-	+	-
-8	+	-	+	+	-	-	+	-
-9	+	-	+	+	+	-	+	-
-10	+	-	+	-	-	-	+	-
+1	+	-	+	+	+	+	+	-
+2	+	-	+	+	+	-	+	-
+3	+	+	+	+	+	-	+	-
+4	+	+	+	+	+	-	+	-
+5	+	-	+	+	+	+	+	-
	(weak)					(weak)		
+6	-	-	+	-	-	+	+	-
+7	+	-	+	+	+	-	+	-
+8	+	-	+	+	+	+	+	-
+9	+	-	+	+	+	+	+	-
+10	+	-	+	-	-	+	+	-
						(weak)		

Ket : Kode isolat bakteri dari urin partisipan -amalgam : -1,-2,-3,-4,-5,-6,-8,-9,-10. Kode isolat bakteri dari urin partisipan +amalgam : +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10

**Hasil Identifikasi**

Semua data yang diperoleh mulai dari uji fisiologi, uji biokimia dan uji morfologi digabungkan untuk menentukan famili bakteri dari ke-19 isolat bakteri

tersebut kemudian hasil yang diperoleh dibandingkan dengan buku *Bergey's Manual Determinative of Bacteriology*. Bakteri-bakteri yang teridentifikasi dapat dilihat dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Bakteri

Kode Bakteri	Genus	Kode Bakteri	Genus
-1	Enterobacteriaceae	+1	Enterobacteriaceae
-2	Enterobacteriaceae	+2	Staphylococcaceae

-3	Staphylococcaceae
-4	Enterobacteriaceae
-5	Staphylococcaceae
-6	Enterobacteriaceae
-8	Corynebacteriaceae
-9	Enterobacteriaceae
-10	Corynebacteriaceae

+3	Enterobacteriaceae
+4	Enterobacteriaceae
+5	Enterobacteriaceae
+6	Veilonellaceae
+7	Peptostreptococcaceae
+8	Staphylococcaceae
+9	Staphylococcaceae
+10	Veilonellaceae

Bakteri teridentifikasi hingga tingkat famili. Isolat -1, -2, -4, -6, -9, +1, +3, +4 dan +5 teridentifikasi sebagai bakteri dari famili Enterobacteriaceae. Isolat -3, -5, +2, +8 dan +9 dari famili Staphylococcaceae. Isolat -8 dan -10 dari famili Corynebacteriaceae, isolat +6 dan +10 dari famili Veilonellaceae, sedangkan isolat +7 dari famili Peptostreptococcaceae.

Beberapa bakteri yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Corynebacteriaceae dan Peptostreptococcaceae dapat ditemukan pada sampel urin (Holt *et al.*, 1994). Pada penelitian ini, urin diambil dari partisipan yang sehat dan tidak sedang didiagnosa mengalami penyakit ISK, sehingga isolat bakteri dari urin dapat berupa bakteri flora normal pada saluran kemih. Meskipun demikian, penelitian-penelitian sebelumnya menemukan adanya isolat bakteri penyebab ISK dari urin, tanpa adanya gejala klinis yang berarti yang dialami oleh orang tersebut, sehingga bakteri penyebab ISK dapat pula diisolasi pada penelitian ini, meskipun urin diambil dari partisipan yang tidak didiagnosa mengalami ISK.

Bakteri yang dapat diinokulasi dari sampel urin diantaranya yaitu bakteri flora normal pada saluran kemih dan bakteri yang bisa menjadi penyebab ISK, yaitu bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.*,

*Streptococcus sp.*, *Corinebacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Peptostreptococcus sp.* dan *Acinetobacter sp.*. *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Enterococcus* dan *Citrobacter* (Sukandar *et al.*, 2008, Jawetz *et al.*, 2010; dan Harti, 2012).

Beberapa jenis bakteri seperti yang disebutkan di atas termasuk dalam famili Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Peptostreptococcaceae dan Corynebacteriaceae. Bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus saprophyticus* termasuk dalam famili Staphylococcaceae. Bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella* dan *Citrobacter*. Bakteri *Peptostreptococcus sp.*, termasuk dalam famili Peptostreptococcaceae dan bakteri *Corinebacterium sp.* termasuk dalam famili peptostreptococcaceae.

**Uji Resistensi Antibiotik**

Uji resistensi antibiotik dilakukan pada media NA dengan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Bakteri dari setiap isolat disuspensikan pada NaCl dan disesuaikan kekeruhannya dengan larutan *Mc Farland 0.5* kemudian suspensi

ini dicampurkan dengan media NA. Setelah media padat cakram antibiotik Cefixime ditempatkan pada permukaan media, demikian juga dengan kontrol negatif berupa kertas saring yang sudah dicelupkan ke dalam akuades sebelumnya.

Cawan petri yang berisi cakram antibiotik Cefixime dan kontrol negatifnya diinkubasi selama 18 jam. Setelah diinkubasi diamati zona hambat yang terbentuk.

Tabel 5. Hasil Pengujian Resistensi Antibiotik (mm)

Kode Bakteri	Diameter Zona Bening (mm)
	Cfx
-1	9
-2	10
-3	12
-4	7
-5	7
-6	15
-8	17
-9	8
-10	8
Ket	Hasil pengujian resistensi bakteri dari urin partisipan yang tidak menggunakan amalgam

Kode Bakteri	Diameter Zona Bening (mm)
	Cfx
+1	16
+2	7
+3	7
+4	7
+5	7
+6	8
+7	10
+8	18
+9	7
+10	7
Ket	Hasil pengujian resistensi bakteri dari urin partisipan yang menggunakan amalgam

Pengujian resistensi antibiotik dilakukan sebanyak tiga kali. Nilai rata-rata dari zona hambat bakteri ditunjukkan pada Tabel 5. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan standar zona hambat antibiotik menurut *Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI)* yang ditunjukkan pada Tabel 6. Hal ini dilakukan untuk mengetahui respon bakteri terhadap antibiotik yang dinyatakan dengan *suceptible*,

*intermediate dan resistant*. Hasil pengujian resistensi bakteri terhadap antibiotik ditunjukkan pada Tabel 7, persentase banyaknya bakteri dengan hasil uji *suceptible, intermediate dan resistant* pada isolat bakteri dari partisipan tanpa amalgam ditunjukkan pada Tabel 8, sedangkan pada isolat bakteri dari partisipan dengan tumpatan gigi amalgam ditunjukkan pada Tabel 9. Gambaran tingkat resistensi antibiotik ditunjukkan pada grafik 1.

Tabel 6. Standar Diameter Zona Hambat Menurut CLSI

Antibiotik	S	I	R
Cefixime	≥19	16-18	≤15
Ket	S = Suceptible, I= Intermediate, R= Resistant		

Tabel 7. Hasil Pengujian Resistensi Antibiotik

Kode Bakteri	Resistensi Cfx	Kode Bakteri	Resistensi Cfx
-1	R	+1	I
-2	R	+2	R
-3	R	+3	R
-4	R	+4	R
-5	R	+5	R
-6	R	+6	R
-8	I	+7	R
-9	R	+8	I
-10	R	+9	R
		+10	R

Ket : Hasil pengujian resistensi bakteri dari urin partisipan yang tidak menggunakan amalgam Cfx=Cefixime

Ket: Hasil pengujian resistensi bakteri dari urin partisipan yang menggunakan amalgam Cfx=Cefixime,

Tabel 8. Persentase Resistensi Antibiotik dari Bakteri pada Urin Partisipan yang Tidak Menggunakan Amalgam

Antibiotik	S	I	R	Persentase (%)		
				S	I	R
Cefixime	-	1	8	0%	11.1%	88.9%

**Ket : S = Suceptible, I= Intermediate, R= Resistant**

Tabel 9. Persentase Resistensi Antibiotik dari Bakteri pada Urin Partisipan yang Menggunakan Amalgam

Antibiotik	S	I	R	Persentase (%)		
				S	I	R
Cefixime	-	2	8	0%	20%	80%

**Ket : S = Suceptible, I= Intermediate, R= Resistant**

Menurut Utami (2012), resistensi terjadi ketika bakteri berubah dalam satu atau lain hal yang menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas obat, senyawa kimia atau bahan lainnya yang digunakan untuk mencegah atau mengobati infeksi. Hasil pengujian antibiotik menunjukkan

tingginya resistensi bakteri terhadap antibiotik Cefixime.

Resistensi bakteri ini dapat terjadi karena beberapa penyebab. Palilingan (2015) dalam tulisannya memaparkan penyebab terjadinya resistensi, yaitu: 1) penggunaan antibiotik yang terlalu sering, tidak rasional, tidak adekuat dan tidak didahului oleh uji sensitivitas; 2) terapi

antibiotik yang lama sehingga dapat memudahkan timbulnya kolonisasi bakteri yang resisten antibiotik akibat mekanisme *selective pressure*; dan 3) perawatan inap yang cukup lama sehingga meningkatkan resiko untuk terinfeksi strain bakteri resisten.

### Identifikasi Bakteri dengan Gen 16S rRNA

Untuk mengidentifikasi bakteri dengan menggunakan gen 16S rRNA yang pertama dilakukan ialah mengekstraksi RNA bakteri dengan metode *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid) yang telah dimodifikasi. Isolat yang dipilih untuk dilakukan ekstraksi RNA ialah isolat -6 dan -9.

Selanjutnya untuk mengamplifikasi RNA maka dilakukan PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Pada tahap ini, dilakukan perbanyakan (amplifikasi) RNA pada daerah tertentu yang dibatasi oleh primer. Hasilnya kemudian digunakan untuk sekuensing DNA (Fatimawali, 2016; Rahayu dan Nugroho, 2015).

RNA yang telah teramplifikasi dielektroforesis terlebih dahulu sebelum dilakukan sekuensing. Proses elektroforesis merupakan uji kualitatif untuk mengukur konsentrasi RNA yang diperoleh. Berat molekul suatu fragmen RNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen RNA standar (marka

DNA) (Rahayu dan Nugroho, 2015). Pada penelitian ini yang digunakan ialah marka berukuran 1 kb. Hasil elektroforesis menunjukkan isolat bakteri memiliki kisaran ukuran 1500 bp, sesuai dengan ukuran gen 16S rRNA yang diharapkan.

Sekuensing bertujuan dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim data diatas ke 1<sup>st</sup> BASE Malaysia. Data hasil sekuensing dibuka dengan menggunakan aplikasi *Geneious*. Aplikasi ini dapat didownload secara gratis diinternet. Tampilan pick kromatogram yang diperoleh dari hasil sekuensing memperlihatkan urutan basa nukleotida secara nyata dari produk amplifikasi gen16S rRNA yang telah dilakukan. Kualitas kromatogram diperlihatkan oleh tingginya peak kromatogram. Semakin tinggi peak maka semakin baik kualitas kromatogram.

Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian di-copy untuk diproses dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara online melalui : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . Hasil BLAST menunjukkan kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang ada pada GenBank. Hasil BLAST ditunjukkan pada Tabel 9.

Tabel 9. Spesies Bakteri yang Diperoleh dari Identifikasi dengan Gen 16S rRNA

No	Isolat Bakteri	Deskripsi Spesies	Max. Identity	Query Cover
1	-6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85%	100%
2	-9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	79%	98%

Berdasarkan hasil sekuensing, isolat bakteri resisten antibiotik -6 dan -9 merupakan bakteri yang sama yaitu *Klebsiella pneumoniae*. Menurut Holt *et al.* (1994), bakteri *Klebsiella pneumoniae* biasanya diisolasi dari urin pasien penderita infeksi saluran kemih. Hasil

identifikasi ini sejalan dengan hasil uji morfologi, fisiologi dan biokimia yang mengarahkan bahwa isolat bakteri -6 dan -9 adalah bakteri anaerob Gram negatif yang termasuk dalam famili enterobacteriaceae.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17(4)**: 840-62
- Dash, HR., and Das S. 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **75**:207-213.
- Fatimawali. 2013. Daya Reduksi Merkuri Isolat Bakteri yang Diisolasi dari Urine Pasien Di Puskesmas Bahu Manado. *Jurnal Ilmiah Farmasi.* **2(3)**:109-115.
- Fatimawali. 2016. *Toksikologi: Detoksifikasi Merkuri*. Unsrat Press, Manado.
- Harti, A.S. 2012. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Kesehatan*. Nuha Medika, Yogyakarta.
- Holt, J.G., Krieg, N.R. Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and William, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup>*. William and Wilkins, Baltimore
- Jawetz, E., Melnick G.E. dan Adelberg, C.A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi ke-1*. Penerjemah: Bagian Mikrobiologi Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba Medika, Surabaya
- Jawetz, E., Melnick, G.E., and Adelberg, C.A. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi ke-25*. Terjemahan Aryandhito Widhi Nugroho. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kattar, M.M., Chavez, J.F., Limaye, A.P., Rassoulilian-Barrett, S.L., Carlson, L.C. 2000. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the Causative Agent of Fatal Septicemia. *J.Clin. Microbiol.* **38**: 789-94
- Palilingan, W., Kepel, B. J. dan Fatimawali. 2015. Uji Resistensi Bakteri *Pseudomonas Sp* yang Diisolasi dari Plak Gigi Terhadap Merkuri dan Antibiotik Amoksisilin. *Jurnal e-Biomedik (eBm).* **3(3)**: 716-721
- Rahayu, D.A. dan Nugroho, E. D.2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi*. Plantaxia, Yogyakarta.

Ranthore, M., Singh, A., and Pant, V.A.  
2012. The Dental Amalgam  
Toxicity Fear: A Myth or Actually.  
*Article. 19(8):81-8*

Rostinawati, T. 2008. *Skrining dan  
Identifikasi Bakteri Penghasil  
Enzim Kitinase dari Air Laut di  
Perairan Pantai Pondok Bali.*  
Penelitian Mandiri. Fakultas  
Farmasi Universitas Padjadjaran,  
Jatinangor

Silver, S., and Phung, L.T. 2005. A  
bacterial view of the periodic table:  
genes and proteins for toxic  
inorganic ions. *J Ind Microbiol  
Biotechnol. 32(11-12): 587-605.*

Sukandar, E.Y., Andrajati, R., Sigit, J.I.,  
Adnyana, K., Setiadi, A.P. dan  
Kusnandar. 2008. *ISO*  
*Farmakoterapi.* ISFI Penerbitan,  
Jakarta.

WHO. 2005. *Mercury in Health Care*  
[policy paper].  
[http://www.who.int/water\\_sanitatio  
n\\_health/medicalwaste/mercurypol  
paper.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/medicalwaste/mercurypol<br/>paper.pdf). [25 September 2016]