

Identifikasi Bakteri Penghasil Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) dengan Metode DDST pada Pus Pasien Ulkus Diabetikum yang Dirawat di Bangsal Interne RSUP Dr. M. Djamil Padang

Diza Sartika¹, Epi Supri Wardi¹, Muhammad Riyadz Aqsha¹, Widya Yolanda Herdissa¹

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Padang, Indonesia

Correspondence: dizasartikalearning@gmail.com

Informasi Artikel

Riwayat artikel:

Diterima 6 Juli 2026

Direvisi 11 Juli 2026

Disetujui 17 Juli 2026

Keyword:

Diabetic Ulcer; Ulkus Diabetikum; ESBL; *Double Disk Synergy Test*; *Proteus mirabilis*; Antibiotic Resistance.

ABSTRAK

Ulkus diabetikum merupakan salah satu komplikasi diabetes mellitus (DM) dengan bentuk infeksi superfisial pada kulit yang disebabkan oleh bakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui spesies bakteri penghasil *Extended Spectrum β Lactamase* (ESBL) di dalam pus pasien ulkus diabetikum di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang dengan menggunakan metode uji skrining ESBL, uji konfirmasi ESBL, Polymerase Chain Reaction (PCR) dan dilanjutkan dengan sekuensing. Untuk uji skrining ESBL digunakan disk antibiotik Amoxicillin + Asam klavulanat, Cefotaxime, Ceftriaxone dan Cefotaxime. Selanjutnya untuk uji konfirmasi digunakan metode Double Disk Synergy Test dengan disk antibiotik Amoxicillin dan Amoxicillin + Asam klavulanat. Jika hasil yang didapat adalah positif ESBL maka sampel di PCR dan dilanjutkan dengan sekuensing. Jumlah sampel pus yang didapat dari 2 orang pasien adalah sebanyak 2 swab, dengan kode swab 1 dan kode swab 2. Pada swab 1 terdapat 3 koloni bakteri yang dikode dengan W1, W2 dan W3. Sedangkan pada swab 2 tidak terdapat koloni bakteri karena bakteri tidak dapat dimurnikan. Dari penelitian ini yang dinyatakan positif ESBL adalah pada swab 1 dengan kode W2, hasil sekuensing menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemiripan 97% dengan spesies *Proteus mirabilis*.



© 2025 The Authors. Published by Pendekar Murisha Indonesia. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

PENDAHULUAN

Penyakit Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang berhubungan dengan defisiensi relatif atau absolut sekresi insulin yang ditandai dengan hiperglikemia kronis yang disebabkan oleh faktor lingkungan dan juga faktor keturunan (Loviana dkk, 2015). Lebih dari setengah populasi dunia yang menderita penyakit diabetes berada di Asia, termasuk Indonesia (Yosmar dkk, 2018). Merujuk kepada prevalensi nasional, Sumatera Barat memiliki prevalensi total diabetes sebanyak 1,3%, dimana Sumatera Barat berada di urutan 14 dari 33 provinsi yang ada di Indonesia. Berdasarkan umur, penderita banyak dalam rentang usia 56-64 tahun dengan prevalensi sebesar 4,8% (Kemenkes, 2013). Berdasarkan data survei pendahuluan, didapatkan hasil

bahwa pasien diabetes mellitus yang dirawat di RSUP Dr. M. Djamil Padang sebanyak 934 pasien pada tahun 2017.

Ulkus diabetikum merupakan salah satu komplikasi kronik diabetes mellitus (DM) yang sering dijumpai dan ditakuti pada penderita diabetes mellitus (Langi, 2013). Terjadinya ulkus diabetikum yaitu apabila pasien sampai mengalami infeksi superfisial pada kulit. Masuknya bakteri menjadi awal terjadinya ulkus. Kadar glukosa yang tinggi menjadi tempat strategis untuk perkembangan bakteri. Bakteri penyebab infeksi pada ulkus diabetikum merupakan gabungan antara bakteri aerob dan anaerob (Misnadiarly, 2006). Jenis bakteri yang ditemukan dalam ulkus diabetikum adalah bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Bakteri gram negatif yang ditemukan biasanya adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp*, *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp*, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* dan *Enterobacter sp*. Sedangkan bakteri gram positif yang ditemukan dalam ulkus diabetikum adalah *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium striatum* dan *Enterococcus sp* (Patil dkk, 2018).

Ada beberapa bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik, salah satunya bakteri penghasil *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) (Bush & Jacoby, 2010). *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL) adalah enzim yang menjadi perantara terjadinya hidrolisis dan inaktivasi dari antibiotika beta-laktam termasuk penisilin, sefalosporin generasi pertama, kedua dan ketiga (Aztal Z dkk, 2003). Masing-masing bakteri mempunyai enzim ESBL yang terletak di dalam plasmid atau kromosom, sehingga penyebaran resistensi sangat mudah terjadi antar strain bahkan antar spesies. Keadaan ini membuat pilihan antibiotika untuk melawan organisme yang memproduksi ESBL sangat terbatas (Kaur & Aggarwal, 2013).

Salah satu cara untuk mengetahui identitas bakteri penyebab ulkus diabetikum yang menghasilkan enzim ESBL adalah identifikasi molekuler dengan menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode molekuler yang berguna untuk menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang relatif singkat (Joshi & Deshpande, 2010). Potongan-potongan DNA tersebut terdiri dari basa DNA yang setelah dilipatgandakan dilakukan pengurutan basa DNA (sekuensing). Kelebihan dari alat PCR ini adalah mempunyai spesifitas tinggi karena menggunakan primer spesifik sebagai pemula dalam proses sintesis DNA, sehingga dapat mempermudah mengetahui spesies suatu organisme pada saat sekuensing dikarenakan tiap-tiap bakteri mempunyai urutan basa DNA yang berbeda-beda. Metode PCR dan sekuensing dipilih untuk digunakan oleh peneliti karena metode ini dapat memastikan spesies bakteri apa yang terdapat didalam sampel pus pasien ulkus diabetikum.

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti ingin mengidentifikasi bakteri penghasil *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) pada pasien ulkus diabetikum di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil, Padang. Bakteri diidentifikasi dari pus (nanah) ulkus pasien, dimana dengan diketahuinya bakteri penyebab dan pola resistensinya terhadap antibiotik maka akan lebih memudahkan dokter atau apoteker dalam pemilihan antibiotik.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

- Media Blood Agar 40 g serbuk Blood Agar dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Setelah disterilkan ditambahkan darah domba segar sebanyak 50 mL, dicampur hingga rata, lalu dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL.
- Media Nutrient Agar 11,5 g serbuk Nutrient Agar dilarutkan dalam 500 mL air suling dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu

121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Setelah disterilkan dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL.

Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil berupa pus ulkus dari 2 orang pasien penderita diabetes mellitus tanpa penyakit infeksi lain yang dirawat inap di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang sesuai dengan kriteria.

Ulkus dibersihkan dengan kain kasa steril yang telah dibasahi NaCl fisiologis secara hati-hati, kemudian perlakuan tersebut diulang sebanyak 2 kali. Ulkus dipencet dan diusap dengan kapas lidi steril pada bagian ulkus tanpa mengenai tepi ulkus. Hasil swab ulkus dimasukkan ke dalam wadah steril yang telah berisi thioglikolat. Tabung ditutup dengan erat dan diberi label (Nur & Marissa, 2016). Sampel 2 swab ulkus kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi dan Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Penanaman Bakteri pada Media Pertumbuhan

Hasil swab dari pus ulkus yang telah diambil diinokulasi dengan menggunakan ose bulat pada media Blood Agar, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Suhartati & Faidah, 2014).

Pewarnaan Gram

Bakteri yang akan diidentifikasi dilakukan pewarnaan gram terlebih dahulu. Gelas objek diberi label lalu difiksasi. Setelah itu ditetaskan NaCl fisiologis dan diambil isolat bakteri menggunakan ose yang telah difiksasi kemudian dioles tipis dan difiksasi kembali. Gentian blue ditetaskan hingga seluruh permukaan tertutupi kemudian dibiarkan selama 1 menit lalu dibilas menggunakan air mengalir. Selanjutnya larutan lugol ditetaskan dan dibiarkan selama 1 menit, dibilas kembali dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Air fuschin ditetaskan ke spesimen lalu dibiarkan selama 30 detik, dibilas kembali dengan air mengalir dan dikeringkan. Gelas objek yang telah kering ditetesi dengan minyak imersi lalu diamati pada mikroskop dengan perbesaran 100x. Bakteri berwarna ungu diindikasikan sebagai bakteri gram positif, sedangkan bakteri berwarna merah diindikasikan sebagai bakteri gram negatif.

Pembuatan Media Uji ESBL

Sebanyak 38 gram Mueller Hinton Agar dilarutkan dalam 1 liter air suling, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit, setelah steril dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL.

Penyiapan Disk Antibiotik Uji ESBL

Disk antibiotik yang digunakan dengan konsentrasi yang telah ditetapkan ditunjukkan pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Disk Antibiotik yang Digunakan

No	Antibiotik	Konsentrasi (µg)	Produksi
1	Ceftazidime	30	BBL
2	Ceftriaxone	30	BBL
3	Cefotaxime	30	BBL
4	Amoxicillin	25	BBL
5	Amoxicillin + Asam Klavulanat	30	BBL

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Sebanyak 2 ose koloni bakteri uji disuspensikan dalam 10 mL NaCl fisiologis dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian dibandingkan kekeruhan suspensi dengan standar McFarland 0,5.

Pembuatan Standar McFarland

Cara pembuatan standar McFarland 0,5 adalah $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175% diambil 0,05 mL dan H_2SO_4 1% diambil 9,95 mL, kedua larutan dihomogenkan dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan absorbansi larutan standar. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Munfaati *dkk*, 2014).

Penentuan Sensitivitas Antibiotika dengan Metode Difusi Agar

Suspensi bakteri diambil dengan kapas lidi steril dan ditanam pada media Mueller Hinton Agar dengan cara dioleskan secara merata pada permukaan media, kemudian disk antibiotik diletakkan dengan hati-hati di atas permukaan media dan ditekan perlahan dengan pinset steril agar benar-benar kontak dengan bakteri pada media. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Muhammad *dkk*, 2017).

Uji Skrining ESBL

Cawan petri yang berisi media Mueller Hinton Agar diberi tanda dengan spidol menjadi empat bagian. Suspensi bakteri diambil dengan kapas lidi steril dan ditanam pada media dengan cara dioleskan secara merata pada permukaan media, kemudian disk antibiotik Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefotaxime dan Amoxicillin + Asam Klavulanat diletakkan dengan hati-hati di atas permukaan media yang sudah dibagi dan ditekan perlahan dengan pinset steril agar benar-benar kontak dengan bakteri pada media. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Muhammad *dkk*, 2017).

Uji Konfirmasi ESBL

Hasil uji skrining ESBL menunjukkan bakteri resisten terhadap antibiotik Amoxicillin + Asam Klavulanat, Ceftazidime, Ceftriaxone dan Cefotaxime, sehingga dilanjutkan dengan uji konfirmasi golongan ESBL menggunakan metode *Double Disk Synergy Test* (DDST) dengan disk Amoxicillin dan Amoxicillin + Asam Klavulanat. Bakteri dinyatakan positif ESBL bila diameter zona hambat pada uji konfirmasi ≥ 5 mm (Julia Garamina *dkk*, 2017).

Isolasi DNA (Metode Boiling)

Heating block diatur pada suhu 95°C. Bakteri disuspensikan dalam 1 mL PBS, kemudian disentrifus dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Supernatan dibuang lalu ditambahkan 2 mL TE Buffer, divortex, dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 95°C. Suspensi bakteri disentrifus kembali dengan kecepatan maksimum selama 5 menit, kemudian supernatan dipindahkan ke dalam microtube 1,5 mL dan disimpan dalam lemari pendingin (freezer) bila tidak langsung digunakan.

Proses Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

DNA sampel yang telah diisolasi diperbanyak dengan metode PCR menggunakan primer 16S rRNA (Tabel 3), menggunakan *Taq* DNA Polymerase dengan *Go Taq Mastermix*. Komponen dan campuran yang digunakan untuk primer 16S rRNA disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komponen dan Campuran untuk Primer 16S rRNA dan DNA Sampel

Pereaksi	Jumlah Pereaksi (μL)
Templat DNA	3
Go Taq mastermix	12,5
Primer forward	1
Primer reverse	1
Nuclease free water	7,5
Volume total	25

Tabel 3. Keterangan Primer

Kode	Sekuen
16S rRNA Forward	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'
16S rRNA Reverse	5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3'

Tabel 4. Siklus Mesin PCR untuk Optimasi Gen Bakteri dan Primer

Jumlah Siklus	Temperatur (°C)	Waktu (menit)
1	95	3
35	95 (denaturasi) 52-62 (annealing) 72 (extension)	30 detik 30 detik 30 detik
1	72 (extension)	5
1	12 (cooling)	Sampai selesai

Setiap komponen dimasukkan ke dalam tube PCR, dengan DNA bakteri dimasukkan terakhir agar tidak terkontaminasi, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan ke mesin PCR.

Pemeriksaan Kualitatif DNA Hasil Isolasi dengan Metode Elektroforesis

Prosedur ini diawali dengan pembuatan gel agarose 1,5% dengan cara menimbang 1,5 gram serbuk agarose, dilarutkan dalam 100 mL TBE di dalam Erlenmeyer, dipanaskan hingga larut dan diperoleh larutan jernih, lalu dituangkan pada cetakan gel yang telah dipasang sisir pembuat sumur sampel dan dibiarkan mengeras pada suhu ruangan. Setelah mengeras, sisir diangkat sehingga terbentuk sumur, kemudian gel dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan dituangkan TBE sampai gel terendam. Sebanyak 5 μL templat DNA hasil amplifikasi ditambah gel red 5 μL dimasukkan ke dalam sumur gel agarose. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1,5% dengan tegangan 100 volt selama 60 menit, dengan untaian DNA 16S rRNA ± 1500 bp.

Sekuensing DNA

Analisis sekuensing dilakukan di laboratorium 1st Base (Singapura). Data hasil sekuensing selanjutnya di-*trimming* dan di-*assembling* dengan program BioEdit, dikonversi ke dalam format FASTA, kemudian di-*BLAST* untuk melihat homologi secara *online* pada pusat basis data DNA NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ulkus diabetikum merupakan salah satu bentuk komplikasi kronis dari diabetes mellitus berupa luka terbuka pada permukaan kulit yang dapat disertai dengan kematian jaringan setempat. Ulkus diabetikum, baik yang mengenai jari kaki maupun yang meluas sampai punggung kaki, disebabkan oleh gangguan pembuluh darah perifer, gangguan saraf perifer, dan disertai infeksi. Infeksi merupakan pintu masuk bakteri yang biasanya bersifat polimikrobial, meliputi bakteri gram negatif dan gram positif, yang menyebar cepat dan menimbulkan kerusakan berat pada jaringan (Aulia Fahmi, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesies bakteri penghasil ESBL penyebab ulkus diabetikum dari pus pasien ulkus diabetikum di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil, Padang. Tahapan yang dilakukan dalam identifikasi bakteri penghasil ESBL pada penelitian ini ada empat, yaitu uji skrining ESBL, uji konfirmasi ESBL, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan sekuensing. PCR merupakan metode molekular yang berguna untuk menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang relatif singkat (Joshi & Deshpande, 2010). Penggunaan metode PCR dikarenakan PCR mempunyai spesifitas tinggi sehingga hasil yang didapatkan saat sekuensing mempunyai persentase kemiripan yang sesuai dengan data yang terdapat pada GenBank (Benson *dkk*, 2008). Sampel pus yang didapat hanya berasal dari 2 pasien, dikarenakan tidak adanya pasien selama periode Februari hingga Maret, dan pada bulan Maret terjadi wabah Covid-19 yang menyebabkan peneliti tidak dapat melanjutkan pencarian pasien karena penelitian dilakukan di rumah sakit rujukan.

Dua sampel yang diperoleh selanjutnya diisolasi, diuji skrining ESBL dan uji konfirmasi ESBL, serta dilakukan isolasi DNA yang kemudian diperbanyak dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing untuk mengetahui secara pasti spesies bakteri penyebab ulkus diabetikum yang menghasilkan enzim ESBL. Hasil isolasi bakteri disajikan pada Tabel 5 berikut.

Tabel 5. Hasil Isolasi Bakteri pada Sampel Swab 1 dan Sampel Swab 2

Sampel Swab 1 (Pasien 1)	Sampel Swab 2 (Pasien 2)
Bakteri 1 (W1)	-
Bakteri 2 (W2)	-
Bakteri 3 (W3)	-

Pada swab 1 (pasien 1) yang ditanam ke dalam media Blood Agar (BA) didapatkan pertumbuhan 3 koloni bakteri. Karena koloni bakteri tersebut harus diperbanyak, dilakukan subkultur (penanaman kembali) pada media Nutrient Agar (NA) agar bakteri dapat tumbuh dengan baik. Pada swab 2 (pasien 2), proses penanaman ke media Blood Agar (BA) tidak optimal dikarenakan peneliti menggoreskan sampel terlalu tebal ke dalam media, sehingga koloni bakteri yang tumbuh sangat rapat dan tidak dapat disubkultur kembali karena saling bercampur. Setelah didapatkan masing-masing koloni bakteri, dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram adalah suatu metode empiris untuk

membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yaitu gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel bakteri. Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk gram positif atau gram negatif agar lebih mudah diidentifikasi (Karmana, 2008).

Tabel 6. Hasil Pewarnaan Gram

Bakteri	Ciri-ciri Mikroskopis
Bakteri 1 (W1)	Basil/batang, berwarna ungu
Bakteri 2 (W2)	Basil/batang, berwarna merah
Bakteri 3 (W3)	Basil/batang, berwarna merah

Berdasarkan Tabel 6, ciri-ciri mikroskopis bakteri W1, W2 dan W3 sesuai dengan literatur (Jawetz, 2010), yaitu pembeda antara bakteri gram positif dan gram negatif terjadi karena penyusun peptidoglikan dan struktur selnya berbeda. Pada proses pewarnaan gram, W1 merupakan bakteri gram positif karena mempunyai peptidoglikan yang tebal sehingga warna gentian blue tidak luntur saat pemberian lugol dan air fuschin luntur saat dibilas, menyebabkan warna sel tetap ungu. W2 dan W3 merupakan bakteri gram negatif karena mempunyai peptidoglikan yang tipis sehingga warna gentian blue ikut luntur dengan pemberian lugol dan menyebabkan warna sel menjadi merah yang berasal dari air fuschin (Waluyo, 2008). Setelah pewarnaan gram, dilakukan uji skrining ESBL untuk melihat apakah bakteri W1, W2 dan W3 terindikasi ESBL atau tidak. Hasil uji skrining ESBL disajikan pada Tabel 7 berikut.

Tabel 7. Hasil Uji Skrining ESBL (CLSI, 2017)

No	Bakteri (Kode Sampel)	CAZ	CTX	CRO	AML	Kesimpulan
1	W1	17,5 mm	10 mm	8,5 mm	-	Terindikasi ESBL
2	W2	17 mm	20 mm	23 mm	-	Terindikasi ESBL
3	W3	-	20 mm	20 mm	39 mm	Terindikasi ESBL
4	Parameter Daya Hambat (CLSI, 2017)	≤ 22 mm	≤ 27 mm	≤ 25 mm	≤ 13 mm	

Keterangan: CAZ = Ceftazidime; CTX = Cefotaxime; CRO = Ceftriaxone; AML = Amoxicillin.

Pada Tabel 7, bakteri dinyatakan terindikasi ESBL apabila memenuhi salah satu parameter zona hambat (indikator ESBL) yang dikutip dari CLSI tahun 2017. Antibiotik Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone dan Amoxicillin mempunyai parameter zona hambat yang berguna sebagai indikator penentu ESBL pada uji skrining. Hasil yang didapat dari bakteri W1, W2 dan W3 adalah terindikasi ESBL karena zona hambat pada beberapa antibiotik lebih kecil atau sama dengan parameter zona hambat (indikator ESBL). Pada bakteri W1, ceftazidime mempunyai zona hambat ≤ 22 mm yaitu 17,5 mm, ceftriaxone mempunyai zona hambat ≤ 25 mm yaitu 8,5 mm, dan cefotaxime mempunyai zona hambat ≤ 27 mm yaitu 10 mm. Pada bakteri W2, ceftazidime mempunyai zona

hambat ≤ 22 mm yaitu 17 mm, ceftriaxone mempunyai zona hambat ≤ 25 mm yaitu 23 mm, dan cefotaxime mempunyai zona hambat ≤ 27 mm yaitu 20 mm. Pada bakteri W3, ceftriaxone mempunyai zona hambat ≤ 25 mm yaitu 20 mm dan cefotaxime mempunyai zona hambat ≤ 27 mm yaitu 20 mm.

Pada perlakuan uji skrining ESBL, antibiotik yang digunakan adalah golongan sefalosporin generasi III dan golongan penisilin (Amoxicillin). Pemilihan antibiotik ini didasarkan pada alasan bahwa antibiotik golongan sefalosporin generasi III dan golongan penisilin seperti amoxicillin merupakan antibiotik yang digunakan untuk terapi ulkus diabetikum, dan di RSUP Dr. M. Djamil Padang antibiotik tersebut masih digunakan dalam pemilihan terapi ulkus diabetikum (Sari, Almasdy & Fatimah, 2018). Alasan lainnya adalah bakteri ESBL merupakan bakteri yang mengalami mutasi gen dengan menghasilkan enzim ESBL, sehingga seharusnya bakteri dapat dibunuh saat pemberian antibiotik, tetapi justru menyebabkan antibiotik tersebut mengalami resistensi (Agistia *dkk*, 2017). Setelah didapatkan hasil uji skrining yang menunjukkan terindikasi ESBL, dilakukan uji konfirmasi ESBL menggunakan inhibitor beta-laktam (amoxicillin + asam klavulanat) dan amoxicillin (Warganegara *dkk*, 2014).

Tabel 8. Hasil Uji Konfirmasi ESBL (Warganegara *dkk*, 2014)

Bakteri	AMC (30 μ g)	AML (25 μ g)
1 (W1)	Tidak mempunyai zona hambat	Tidak mempunyai zona hambat
2 (W2)	25 mm	Tidak mempunyai zona hambat
3 (W3)	37 mm	39 mm

Keterangan: AMC = amoxicillin + asam klavulanat; AML = amoxicillin.

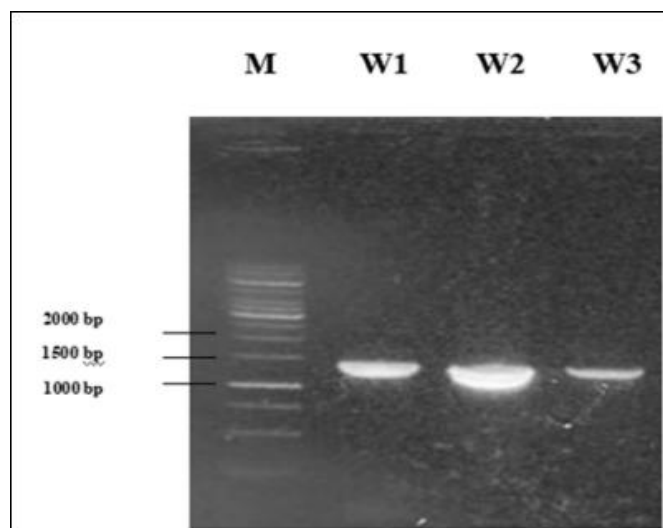
Peneliti melakukan uji konfirmasi ESBL menggunakan metode *Double Disk Synergy Test* (DDST). Penggunaan inhibitor beta-laktam amoxicillin + asam klavulanat dikarenakan amoxicillin masih digunakan dalam terapi ulkus diabetikum. Jika pada uji skrining amoxicillin mengalami resistensi, maka pada uji konfirmasi amoxicillin dikombinasikan dengan asam klavulanat agar memberikan efektivitas dalam membunuh bakteri pada ulkus diabetikum. Alasan lain pemilihan amoxicillin + asam klavulanat adalah tidak tersedianya inhibitor beta-laktam golongan sefalosporin + asam klavulanat di Laboratorium Mikrobiologi dan Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dan tidak memungkinkan untuk dibeli karena harganya mahal dan jarang digunakan di laboratorium tersebut.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Julia Garamina & Wulan Sumekar (2017), bila bakteri positif ESBL maka akan terbentuk zona hambat pada disk inhibitor beta-laktam dengan diameter ≥ 5 mm. Dari hasil pada Tabel 8 dapat dilihat bahwa W1 tidak mempunyai zona hambat terhadap AMC dan AML, sehingga bakteri W1 tidak termasuk bakteri penghasil ESBL atau negatif ESBL. Pada W2, terdapat zona hambat ≥ 5 mm terhadap AMC dan tidak terbentuk zona hambat pada AML, sehingga W2 dinyatakan positif ESBL. Pada W3, uji konfirmasi ESBL menunjukkan sensitivitas zona hambat terhadap AMC dan AML, sehingga W3 dinyatakan negatif ESBL. Alasan mengapa W2 dinyatakan positif ESBL, bukan W1 dan W3, adalah karena bakteri penghasil ESBL sudah pasti akan mengalami resistensi saat diberikan antibiotik (AML). Resistensi ini disebabkan oleh terjadinya hidrolisis cincin beta-laktam sehingga mengakibatkan mutasi gen antara antibiotik dan bakteri tersebut. Pada AMC akan menunjukkan sensitivitas dikarenakan AMC merupakan inhibitor beta-laktam yang dapat menghambat hidrolisis cincin beta-laktam pada antibiotik, sehingga AMC

mempunyai zona hambat yang lebih besar (sensitif) pada bakteri dibandingkan AML (Goodman, 2012).

Setelah mengetahui bakteri yang terdapat pada pus tersebut positif ataupun negatif ESBL, peneliti mengerjakan tahap selanjutnya yaitu persiapan identifikasi sampel yang dimulai dengan tahapan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan hasil DNA yang optimal tanpa gangguan dari senyawa lain. Hasil isolasi DNA kemudian diperbanyak salinan sekuensnya menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) agar mempermudah identifikasi bakteri pada saat disekuensing. PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus), dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA (Darmo Handoyo, 2001). Alasan pemilihan PCR adalah karena salah satu keunggulan PCR adalah mempunyai sensitivitas tinggi untuk mendeteksi DNA suatu sampel, sehingga hasil PCR sangat membantu untuk memperoleh hasil sekuensing yang akurat.

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekular berbasis PCR yakni pemilihan primer yang tepat. Primer PCR merupakan oligonukleotida yang berperan untuk mengawali proses amplifikasi molekul DNA. Keberadaan primer PCR tersebut menyebabkan gen target akan teramplifikasi sepanjang reaksi PCR berlangsung (Darmo Handoyo, 2001). Peneliti menggunakan primer 16S rRNA dengan ukuran DNA sebesar 1500 basepair (bp). Menurut Rinanda (2011), pemilihan primer 16S rRNA dikarenakan hampir seluruh spesies bakteri telah ditentukan urutan basa nitrogennya dan data urutan basa nitrogen dengan primer 16S rRNA sudah lengkap tersimpan di GenBank NCBI, sehingga dapat dijadikan pedoman dalam menentukan spesies suatu bakteri. Dari hasil amplifikasi dapat dilihat bahwa konsentrasi primer sangat berpengaruh terhadap kenampakan pita DNA (Joko, Kusumandari & Hartono, 2011). Setelah PCR selesai, dilakukan elektroforesis untuk mengetahui ukuran DNA.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis

Keterangan: M = Marker; W1 = Bakteri 1; W2 = Bakteri 2; W3 = Bakteri 3.

Pada Gambar 1, pita DNA W1, W2 dan W3 menandakan pita DNA yang terdapat pada bakteri 1, 2 dan 3. Pita DNA tersebut menunjukkan adanya molekul DNA pada kisaran ukuran yang berbeda-beda. Pada data hasil penelitian, W1 mempunyai ukuran DNA sebesar 1276 bp, W2 mempunyai ukuran DNA sebesar 1318 bp, dan W3 mempunyai ukuran DNA sebesar 1304 bp. Namun ukuran DNA ditulis 1500 bp karena ukuran DNA tetap berada dalam kisaran ≤ 1500 bp,

sehingga disesuaikan dengan ukuran DNA primer yang digunakan, yaitu primer 16S rRNA (Rinanda, 2011). Semakin rendah ukuran DNA maka semakin jauh pula DNA bergerak, dengan kata lain mobilitasnya tinggi. Sebaliknya, DNA dengan ukuran yang lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek, dengan kata lain mobilitasnya rendah (Joko *dkk*, 2011). Konsentrasi DNA juga berpengaruh pada ketebalan pita DNA pada hasil elektroforesis. Tebal tipisnya pita DNA yang terbentuk menunjukkan kandungan atau banyaknya DNA yang mempunyai ukuran DNA yang sama, yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sesuai dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Dorado *dkk*, 2018).

Setelah dilakukan elektroforesis untuk memastikan spesies bakteri yang terdapat pada sampel, dilakukanlah sekuensing. Hasil sekuensing dikeluarkan oleh 1st Base Singapore lalu di-BLAST pada pusat basis data DNA NCBI. Hasil *BLAST* yang didapat antara lain: bakteri 1 (Gambar 2) merupakan bakteri *Corynebacterium striatum* strain DSM 1566 dengan *query cover* sebesar 99% dan persentase kemiripan identitas sebesar 99,89%.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Corynebacterium striatum strain DSM 1566 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN175847.1
Corynebacterium striatum strain DSM 1564 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN175927.1
Corynebacterium striatum strain 191580305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121148.1
Corynebacterium striatum strain 191580997 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121147.1
Corynebacterium striatum strain 191570137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121146.1
Corynebacterium striatum strain 191500687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121145.1
Corynebacterium striatum strain 191500564 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121144.1
Corynebacterium striatum strain 191010621 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121143.1
Corynebacterium striatum strain 191010620 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121142.1
Corynebacterium striatum strain 191000683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121140.1
Corynebacterium striatum strain 190920527 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121139.1
Corynebacterium striatum strain 190860457 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1722	1722	99%	0.0	99.89%	MN121138.1
Corynebacterium striatum strain 216 chromosome, complete genome	1722	6883	99%	0.0	99.89%	CP024932.1
Corynebacterium striatum strain 215 chromosome, complete genome	1722	6872	99%	0.0	99.89%	CP024931.1

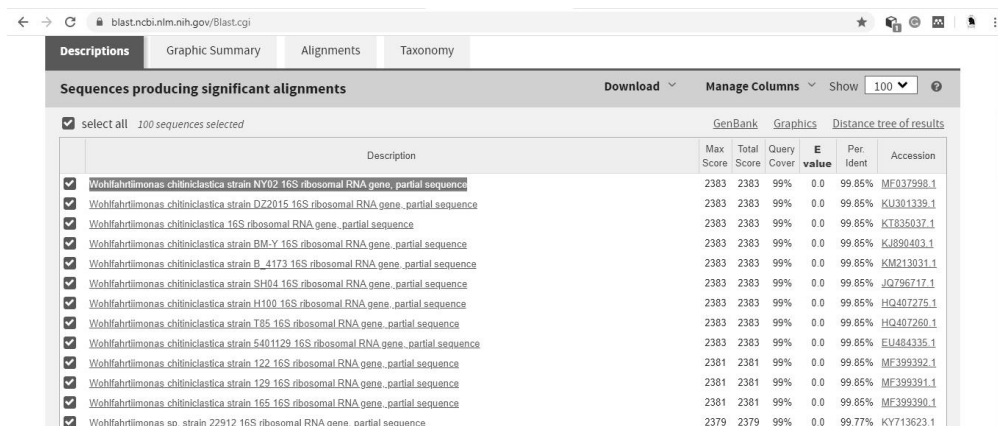
Gambar 2. Significant Alignments *Corynebacterium striatum*

Bakteri 2 (Gambar 3) merupakan bakteri *Proteus mirabilis* strain ER37 dengan *query cover* 97% dan persentase kemiripan identitas sebesar 100%.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Proteus mirabilis strain ER37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MT124562.1
Proteus mirabilis strain 1701092 chromosome, complete genome	2370	16548	97%	0.0	100.00%	CP042857.1
Proteus mirabilis strain E4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN922516.1
Proteus mirabilis strain E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN922513.1
Proteus mirabilis strain NA-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN882646.1
Proteus mirabilis strain UFV 131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN546001.1
Proteus mirabilis strain UFV 127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN545972.1
Proteus mirabilis strain UFV 105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN545923.1
Proteus mirabilis strain AGMDRUC5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN795608.1
Proteus mirabilis strain ENT1301 chromosome	2370	16581	97%	0.0	100.00%	CP044135.1
Proteus mirabilis strain S1959 chromosome, complete genome	2370	2370	97%	0.0	100.00%	CP043870.1
Proteus mirabilis strain CRPM10 chromosome, complete genome	2370	16592	97%	0.0	100.00%	CP043332.1
Proteus mirabilis strain VAC chromosome, complete genome	2370	16537	97%	0.0	100.00%	CP042907.1
Proteus mirabilis strain Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2370	2370	97%	0.0	100.00%	MN203637.1

Gambar 3. Significant Alignments *Proteus mirabilis*

Bakteri 3 (Gambar 4) merupakan bakteri *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* strain NY02 dengan *query cover* 99% dan persentase kemiripan identitas sebesar 99,85%.



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain NY02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	ME037598.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain DZ2015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	KU301339.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	KT835037.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain BM-Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	KJ890403.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain B_4173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	KM213031.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain SH04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	JQ796717.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain H100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	HQ407275.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain T85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	HQ407260.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain 5401129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	99%	0.0	99.85%	EU484335.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain 122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2381	2381	99%	0.0	99.85%	MF393932.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain 129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2381	2381	99%	0.0	99.85%	MF393931.1
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica strain 165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2381	2381	99%	0.0	99.85%	MF393930.1
Wohlfahrtiimonas sp. strain 22912 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2379	2379	99%	0.0	99.77%	KY713623.1

Gambar 4. Significant Alignments *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*

Sekuensing seharusnya dilakukan hanya pada sampel yang sudah terkonfirmasi positif ESBL (Gambar 3). Namun, peneliti melakukan sekuensing juga pada sampel lainnya (Gambar 2 dan Gambar 4) untuk dijadikan referensi bagi peneliti dan pembaca lainnya mengenai keragaman bakteri yang terdapat pada pus pasien ulkus diabetikum, meskipun ada yang menghasilkan enzim ESBL dan ada yang tidak menghasilkan enzim ESBL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian identifikasi bakteri penghasil ESBL pada pus pasien ulkus diabetikum, dari 3 bakteri yang didapatkan dalam 1 sampel pus pasien ulkus diabetikum yang dirawat di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil, Padang dengan kode W1, W2 dan W3, bakteri yang terindikasi menghasilkan *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) adalah bakteri kode W2, dengan persentase kemiripan 97% terhadap spesies *Proteus mirabilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agistia, N., Mukhtar, H., & Nasif, H. (2017). Efektifitas antibiotik pada pasien ulkus kaki diabetik. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.4.1.144>
- Aulia Fahmi, M. (2014). *Profil pasien ulkus diabetik di Rumah Sakit Umum Daerah Cengkareng* (Skripsi). Universitas Esa Unggul.
- Aztal, Z., Sharif, F. A., & Abdallah, S. A. (2004). *Extended spectrum beta lactamases in Escherichia coli isolated from community-acquired urinary tract infection in the Gaza Strip*. Palestina.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36(Suppl. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm929>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Darmo Handoyo, A. R. (2001). *Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Surabaya: Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Surabaya.
- Decroli, E. (2008). *Profil ulkus diabetik pada penderita rawat inap Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang*. Padang: Majalah Kedokteran Indonesia.

- Dorado, G., Besnard, G., Unver, T., & Hernández, P. (2018). Polymerase chain reaction (PCR). *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 1–3(6), 473–492. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08997-2>
- Goodman, A. (2012). *Dasar Farmakologi Terapi* (Edisi 10). Jakarta: EGC.
- Joko, T., Kusumandari, N., & Hartono, S. (2011). Optimasi metode PCR untuk deteksi *Pectobacterium carotovorum*, penyebab penyakit busuk lunak anggrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2), 54–59. <https://doi.org/10.22146/jpti.9813>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97.
- Julia Garamina, H., & Wulan Sumekar, D. (2017). Analisis perbandingan uji sensitivitas antibiotik dan keberadaan Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) pada *Escherichia coli* dari feses tenaga medis di ruang rawat inap dewasa dan ruang rawat inap anak. *Artikel Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung*, 4, 275–282.
- Karmana, O. (2008). *Biologi*. Jakarta: PT. Grafindo Media Pratama.
- Kaur, M., & Aggarwal, A. (2013). Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM genes among the extended spectrum β -lactamase producing isolates of Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital of North India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(4), 642–645. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5081.2872>
- Kemenkes RI. (2013). *Riset kesehatan dasar*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI.
- Langi, Y. A. (2013). Penatalaksanaan ulkus kaki diabetes secara terpadu. *Jurnal Biomedik (JBM)*, 3(2), 95–101. <https://doi.org/10.35790/jbm.3.2.2011.864>
- Loviana, R. R., Rudy, A., & Zulkarnain, E. (2015). Faktor risiko terjadinya ulkus diabetikum pada pasien diabetes mellitus yang dirawat jalan dan inap di RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(1), 243–248.
- Misnadiarly. (2006). *Diabetes mellitus gangren, ulcer, infeksi: Mengenal gejala, menanggulangi, mencegah komplikasi*. Jakarta: Pustaka Populer Obor.
- Muhammad, A., Nurulita, & Budiman, A. (2017). *Uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri penyebab infeksi saluran kemih pada pasien rawat inap di RSUP Prof. DR. Margono Soekarjo Purwokerto*. Purwokerto: Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Munfaati, P. N., Evie, R., & Guntur, M. (2014). *Aktivitas senyawa antibakteri ekstrak herba meniran (Phyllanthus niruri) terhadap pertumbuhan bakteri Shigella dysenteriae secara in vitro*.
- Nur, A., & Marissa, N. (2016). Gambaran bakteri ulkus diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Meuraxa tahun 2015. *AVERROUS: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Malikussaleh*, 2(1), 44.
- Patil, Y., Khadse, R., Chavan, S., & Raut, S. (2018). Bacteriological profile of diabetic foot infections. *Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 5.
- Rinanda, T. (2011). Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11(3), 172–177.
- Sari, Y. O., Almasdy, D., & Fatimah, A. (2018). Evaluasi penggunaan antibiotik pada pasien ulkus diabetikum di Instalasi Rawat Inap (IRNA) Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(2), 102–111. <https://doi.org/10.25077/JSFK.5.2.102-111.2018>

- Suhartati, R., & Faidah, E. N. (2014). Identifikasi bakteri Oxacillin Resistant Staphylococcus Aureus (ORSA) pada ulkus penderita diabetes mellitus di ruang perawatan bedah Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Tasikmalaya. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 11(1), 161–167.
- Waluyo, L. (2008). *Teknik dan metode dasar dalam mikrobiologi*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Warganegara, E., & Apriliana, E. (2014). The determining type of extended spectrum β -lactamase enzyme (ESBL) from Escherichia coli resistance cephalosporine of third generation in RSUD Abdoel Moeloek Bandar Lampung. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 4(7), 87–96.
- Yosmar, R., Almasdy, D., & Rahma, F. (2018). Survei risiko penyakit diabetes melitus terhadap kesehatan masyarakat Kota Padang. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(Agustus), 134–141.