

Deteksi Gen Resistensi Ampisilin (bla) pada *Escherichia coli* Isolat Klinik dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Tiana Milanda, Bonar C. Saragih, Sri A. F. Kusuma

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Abstrak

Escherichia coli merupakan bakteri batang Gram negatif yang dapat menjadi patogen jika jumlahnya meningkat atau berada di luar saluran pencernaan. *E. coli* yang patogen akan menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan diare atau infeksi pada saluran kemih. Ampisilin merupakan salah satu antibiotik pilihan untuk mengatasi penyakit infeksi tersebut. Akhir-akhir ini ampisilin tidak lagi digunakan sebagai obat pilihan karena banyaknya kasus resistensi *E. coli* terhadap antibiotik tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi antibiotik ampisilin pada *E. coli* isolat klinik. Sampel yang digunakan adalah hasil isolasi urin midstream pasien dengan gejala sistitis di Rumah Sakit Hasan Sadikin (RSHS) Bandung. Uji resistensi antibiotik menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), baik PCR-koloni maupun PCR-DNA. Berdasarkan hasil uji resistensi terhadap ampisilin, *E. coli* hasil isolasi telah resisten terhadap ampisilin. Elektroforesis hasil PCR-koloni dan PCR-DNA menunjukkan bahwa resistensi terhadap ampisilin disebabkan oleh gen bla berukuran 199 pb. Diperlukan pemilihan antibiotik yang selektif dan rasional untuk mencegah resistensi ampisilin pada pasien dengan gejala sistitis.

Kata kunci: bla, *Escherichia coli*, gen resistensi ampisilin, *polymerase chain reaction*

Detection of Ampicillin Resistance Genes (bla) in Clinical Isolates of *Escherichia coli* with Polymerase Chain Reaction Method

Abstract

Escherichia coli is a rod negative Gram which could be pathogenic, if its value increases or located in outer gastrointestinal tract. Pathogenic *E. coli* will produce enterotoxin which will cause diarrhea or infection in urine tract. Ampicillin was one of particular antibiotics to overcome infection. Ampicillin nowadays is no longer used as first choice medicine, because of its resistance case. The aim of this research was to detect the presence of gene which is responsible to ampicillin resistant *E. coli*. We used isolated midstream urine from cystitis object in Hasan Sadikin Hospital as samples. Polymerase Chain Reaction (PCR) method (colony-PCR and DNA-PCR) were performed to investigate the antibiotic resistency. Based on the result of antibiotic susceptibility testing to ampicillin, *E. coli* samples were resistant to ampicillin. Electropherogram products of colony-PCR and DNA-PCR showed that the resistance case of ampicillin caused by bla gene (199 bp). Our result suggested that bla gene may be use to detect the ampicillin resistance. Furthermore, selective and rational antibiotic treatment is required to prevent ampicillin resistance in patients with symptoms of cystitis.

Key words: Ampicillin resistance gene, bla, *Escherichia coli*, polymerase chain reaction

Korespondensi: Dr. Tiana Milanda, M.Si., Apt., Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia, email: tiana_milanda@yahoo.com

Naskah diterima: 15 Juni 2014, Diterima untuk diterbitkan: 2 Agustus 2014, Diterbitkan: 1 September 2014

Pendahuluan

Escherichia coli merupakan bakteri batang Gram negatif di dalam saluran pencernaan mamalia. Flora normal ini dapat menjadi patogen apabila terjadi peningkatan jumlah atau berada di luar saluran pencernaan. *E. coli* akan memproduksi enterotoksin yang dapat menyebabkan diare atau infeksi pada saluran kemih.¹ Salah satu antibakteri yang digunakan untuk mengatasi infeksi *E. coli* adalah ampicilin.

Antibiotik ampicilin bekerja dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel oleh bakteri. Akhir-akhir ini ditemukan banyak kasus resistensi *E. coli* terhadap ampicilin, sehingga penggunaannya untuk mengatasi infeksi bakteri ini perlu dipertimbangkan kembali.^{1,2,3}

Deteksi *E. coli* yang resisten ampicilin dapat dilakukan melalui uji resistensi secara mikrobiologi, akan tetapi metode ini tidak mampu mendeteksi penyebab resistensi. Bakteri ini diduga mampu mensintesis enzim beta-laktamase yang menghidrolisis cincin beta-laktam pada struktur ampicilin, sehingga antibakteri ini kehilangan aktivitasnya.^{1,2,3}

Enzim betalaktamase dikode oleh gen resistensi ampicilin (*bla*) dalam suatu plasmid sehingga sifat resistensi tersebut dapat dipindahkan dari satu bakteri ke bakteri lainnya.⁴ Deteksi gen *bla* dalam DNA *E. coli* dapat dilakukan dengan menggunakan metode molekuler seperti metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Deteksi dilakukan dengan mengamplifikasi gen *bla* secara *in vitro* pada konsentrasi DNA *E. coli* yang sangat kecil.⁵

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *bla* pada beberapa *E. coli* isolat klinik yang resisten terhadap ampicilin melalui metode PCR, baik PCR-koloni maupun PCR-DNA. Penelitian ini berguna sebagai dasar pemilihan terapi antibiotik pada pasien sistitis.

Metode

Sampel klinik yang digunakan berupa urin *midstream* yang berasal dari pasien dengan gejala klinik sistitis (infeksi saluran kemih) di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung. Pasien-pasien tersebut merupakan pasien rawat inap yang belum menjalani terapi pengobatan. Pasien yang terlibat sudah memperoleh *informed consent* sebelum berpartisipasi dalam penelitian ini.

Bahan yang digunakan berupa cakram antibiotik ampicilin 10 µg (Oxoid), serbuk ampicilin pro injeksi 1 g (Dumex), larutan Mac Farland 0,5, pereaksi Kovac (n-amil alkohol 75 mL, asam klorida 25 mL, p-dimetilaminbenzaldehid 5 g), indikator metil merah, pereaksi Barrit A (5 g α-naftol dan 100 mL alkohol 96 %), pereaksi Barrit B (KOH 40%), Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), isopropanol, etanol 70 %, dapar Taq polimerase 10 x (MD Bio-Korea), Taq DNA polimerase (MD Bio-Korea), MgCl₂ 25 mM (MD Bio-Korea), primer forward 5' ATACCGCGCCACATAGCAGAA 3' 20 pmol (Proligo), primer reverse 5' AGTATTCAACATTTCCGTGTCG 3' 20 pmol (Proligo), dNTP 2,5 mM (MD Bio-Korea), agarosa (Pronadisa), marka pUC19/HinfI, plasmid pUC19, *E. coli* ATCC 25922, TAE 1X, etidium bromida 1 mg/mL (USB), dapar loading 10X (sukrosa 40%, bromfenol biru 0,25%), natrium klorida, dan air suling ganda.

Medium yang digunakan adalah agar Mac-Conkey (Oxoid), agar eosin metilen biru (Oxoid), agar Mueller-Hinton (Oxoid), agar Simmons Citrate, medium indol, dan medium cair Methyl Red-Voges Proskauer.

Isolasi, Identifikasi, dan Pemurnian *E. coli*

Sebanyak tiga sampel klinik ditanamkan pada agar Mac-Conkey dalam cawan petri,

lalu dinkubasi selama 18–24 jam dalam inkubator bersuhu 37 °C. Uji *presumptive* dilakukan terhadap bentuk koloni. *E. coli* akan membentuk koloni merah dengan permukaan yang kering.

Penegakan hasil uji *presumptive* dilakukan melalui uji biokimia IMVIC, yaitu meliputi uji indol, uji sitrat, uji *Methyl Red* (MR) dan uji *Voges-Proskauer* (VP). Pada uji indol, satu ose bakteri ditusukkan pada medium indol, diinkubasikan dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam, lalu ditambahkan 10–12 tetes pereaksi Kovac. Reaksi indol positif, apabila terbentuk cincin merah di permukaan medium. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri menghidrolisis triptofan menjadi indol.

Pada uji *Methyl Red* (MR), satu ose bakteri diinokulasikan pada medium cair *Methyl Red-Voges Proskauer*, lalu diinkubasikan dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam. Biakan tersebut ditambahkan tiga sampai empat tetes indikator merah metil. Warna merah pada medium menunjukkan reaksi positif, yaitu bakteri dapat mengoksidasi glukosa dan menghasilkan asam. Pada uji *Voges Proskauer* (VP), satu ose bakteri diinokulasikan pada medium *Methyl Red-Voges Proskauer*, lalu diinkubasikan dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam. Biakan tersebut ditambahkan tiga sampai empat tetes pereaksi Barrit, lalu dikocok keras-keras selama 20–30 detik. Reaksi VP positif, bila terjadi pembentukan asam, yang ditandai berubahnya warna medium menjadi merah muda.

Pada uji sitrat, sebanyak satu ose bakteri digoreskan secara zig-zag pada agar miring *Simmons-Citrate*, lalu medium diinkubasikan dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 18–24 jam. Warna medium yang berubah menjadi biru menunjukkan hasil uji sitrat yang positif. Hal ini terjadi karena bakteri dapat memfermentasi sitrat sehingga suasana medium menjadi basa. Koloni *E. Coli* yang memenuhi kriteria ditanamkan pada agar

eosin etilen biru (EMB) dalam cawan petri lalu diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam.

Uji Resistensi *E. coli* Isolat Klinik terhadap Ampisilin

Masing-masing koloni dari *E. coli* isolat klinik dan *E. coli* ATCC 25922 (bakteri standar yang sensitif terhadap ampicilin) disuspensikan dalam larutan natrium klorida fisiologis. Kekeruhan suspensi bakteri diatur agar sama dengan kekeruhan Mc-Farland 0,5, sehingga mengandung sekitar 1×10^8 /mL sel bakteri.⁶ Sebanyak 20 µL masing-masing suspensi bakteri disebarkan pada setengah permukaan agar Mueller-Hinton dalam cawan petri, menggunakan tangkai gelas bengkok (*spreader bent glass rod*). Setelah dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit, cakram antibiotik ampicilin 10 µg diletakkan di atas permukaan agar secara aseptis. Cawan diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 18–24 jam, lalu diameter hambat diukur menggunakan jangka sorong. Resistensi *E. coli* isolat klinik terhadap ampicilin ditunjukkan dengan tidak atau terbentuknya zona hambat berdiameter kurang dari 13 mm di sekitar cakram.

Isolasi DNA Total Bakteri *E. coli* pada Isolat Klinik

Sebanyak 1 mL suspensi *E. coli* isolat klinik dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL, lalu dilakukan sentrifugasi pada 13.000 ppm selama 2 menit untuk memperoleh endapan sel. Supernatan dibuang lalu endapan sel disuspensikan kembali dalam 600 µL larutan pelisis sel dan diinkubasi dalam penangas air bersuhu 65 °C selama 5 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, campuran ditambahkan 3µL larutan RNase. Tabung dihomogenkan kemudian diinkubasi pada penangas air bersuhu 37 °C selama

15 menit. Setelah didinginkan sampai suhu kamar, campuran ditambahkan 20 µL larutan pengendap protein, lalu divorteks pada pada kecepatan tertinggi selama 20 detik. Campuran diinkubasi dalam penangas es selama 5 menit, lalu dilakukan sentrifugasi pada 13.000 ppm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 mL yang baru, lalu ditambahkan 600 µL isopropanol. Tabung dihomogenkan perlahan sampai terlihat benang-benang halus berwarna putih, lalu disentrifugasi pada 13.000 ppm selama 2 menit. Supernatan dibuang, lalu tabung dibalikkan di atas kertas tisu. Setelah kering, ke dalam tabung ditambahkan 600 µL etanol 70% dingin. Tabung dihomogenkan perlahan untuk mencuci endapan DNA, lalu dilakukan sentrifugasi pada 13.000 ppm. Setelah tabung dibalikkan di atas kertas tisu, larutan DNA *rehydration* ditambahkan untuk merehidrasi DNA. DNA *E. coli* isolat klinik disimpan pada suhu 2–8 °C.

Amplifikasi Gen bla pada *E. coli* Isolat Klinik dengan Metode PCR-koloni dan PCR-DNA

Amplifikasi gen bla dilakukan terhadap koloni bakteri dan isolat DNA total dari *E. coli* isolat klinik. Proses amplifikasi memerlukan sepasang primer khusus, yaitu primer forward bla (5'ATACCGCGCCACATAGC AGAA3') dan primer reverse bla (5'AGTATTCAACATTTCCGTGTCG3'), yang dapat mengenali sekuens bla. Komponen reaksi PCR per tabung terdiri dari 0,5 µL primer forward bla 20 pmol dan 0,5 µL reverse bla 20 pmol, 0,5 µL dNTP 20 mM, 2,5 µL dapar Taq DNA polymerase 10x, 5 unit/µL Taq polymerase sebanyak 0,2 µL, 1,5 µL MgCl₂ 25 mM, dan air suling ganda sebanyak 14,3 µL. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.

Sampel yang diamplifikasi terdiri dari 4 sampel, yaitu 1 sampel koloni (1 ose koloni

E. coli isolat klinik 1 dan 5 µL air suling ganda), 2 sampel isolat DNA total (masing-masing 5 µL *E. coli* isolat klinik 1 dan 2), dan kontrol positif berupa 3 µL plasmid pUC19 yang mengandung gen bla dan 2 µL air suling ganda.

Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *thermocycler* (Parkin-Elmer) dengan tahap denaturasi awal 94 °C selama 5 menit, 30 siklus PCR yang terdiri dari tahap denaturasi 94 °C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan polimerasi fragmen DNA 72 °C selama 60 detik, diakhiri tahap polimerasi akhir 72 °C selama 10 menit.

Sebanyak 10 µL masing-masing produk PCR ditambahkan 1 µL dapar *loading*, lalu dimasukkan ke lubang-lubang pencadang pada gel agarosa 1%. Sebagai marka DNA digunakan pUC 19/Hinfl. Elektroforesis dilakukan dalam dapar TAE 1x, pada tegangan 100 volt, kekuatan arus 400 mA, selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat di bawah sinar UV λ 312 nm menggunakan alat *transilluminator* UV (Cole-Palmer). Ukuran teoritis gen bla adalah sekitar 200 pb.⁷

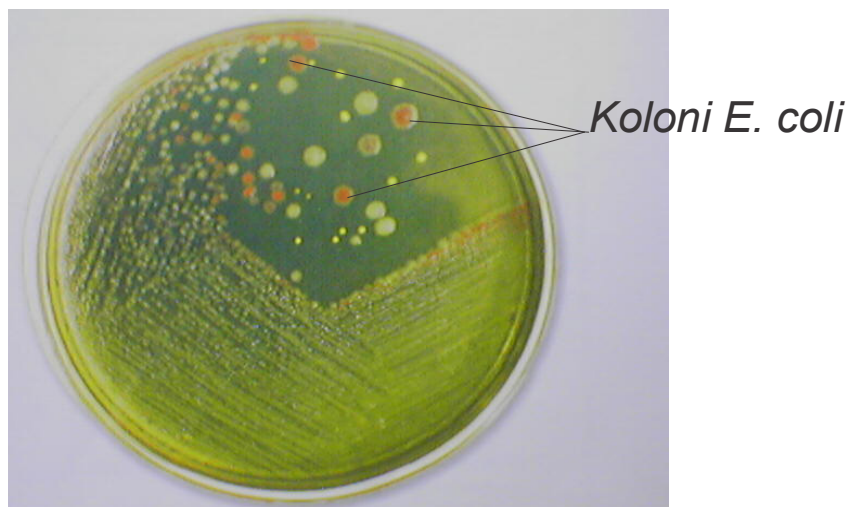
Analisis Hasil Migrasi Produk PCR

Analisis hasil migrasi produk PCR dilakukan melalui regresi linier. Sumbu x merupakan jarak migrasi (cm) pita DNA dari lubang pencadang ke titik akhir migrasi dan sumbu y adalah log ukuran sekuens DNA (pb/pasangan basa). Hubungan matematik antara kecepatan migrasi dan ukuran sekuens DNA adalah sebagai berikut:⁸

$$y = bx + a$$

Hasil

Uji *presumptive* koloni *E. coli* dari ketiga sampel klinik dapat dilihat pada Gambar 1. Koloni ketiga sampel klinik pada medium Mac Conkey berwarna merah dengan



Gambar 1 Hasil Uji Presumptive *E. coli* Isolat Klinik pada Medium Mac Conkey

permukaan yang kering.

Hasil uji biokimia IMVIC beberapa genus bakteri pada keluarga *Enterobacteriaceae* terdapat pada Tabel 1. Hasil uji biokimia

IMVIC dari tiga biakan dapat dilihat pada Tabel 2. Ketiga biakan tersebut memberikan hasil uji biokimia yang menunjukkan bahwa ketiganya adalah *E. coli*.

Tabel 1 Hasil Uji Biokimia IMVIC dari Beberapa Genus Bakteri pada Keluarga *Enterobacteriaceae*

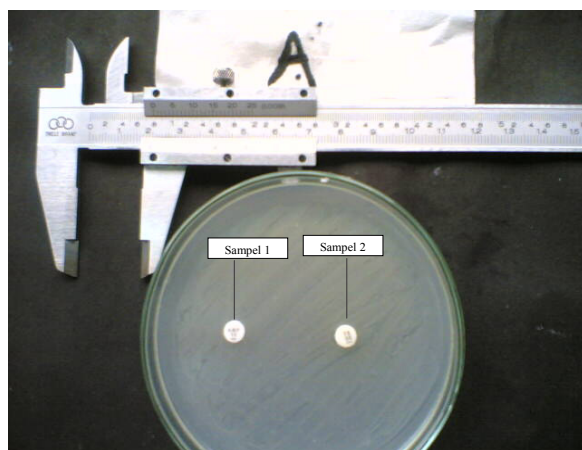
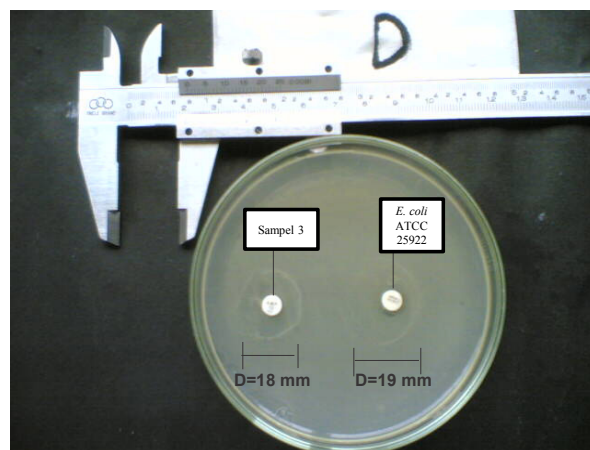
Genus	Uji indol	Uji MR	Uji VP	Uji sitrat
Escherichia	(+)	(+)	(-)	(-)
Enterobacter	(-)	(-)	(+)	(+)
Klebsiella	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabel 2 Hasil Uji Biokimia IMVIC dari Biakan *E. coli* Isolat Klinik

Genus	Uji indol	Uji MR	Uji VP	Uji sitrat
1	(+)	(+)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(-)

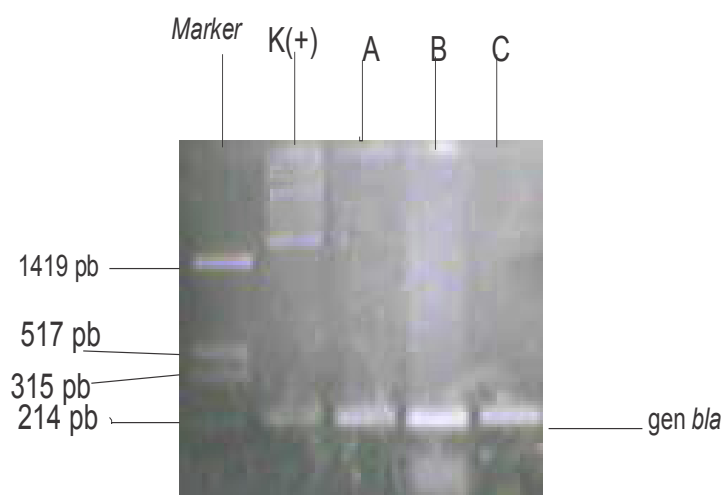
Keterangan :

- Uji indol (+), permukaan medium berwarna merah setelah ditetesi 10-12 pereaksi Kovac
- Uji indol (-), warna permukaan medium tidak berubah, setelah ditetesi 10-12 tetes pereaksi Kovac
- Uji metil-merah (+), terjadi pembentukan asam (warna medium menjadi merah), setelah penambahan metil merah
- Uji metil-merah (-), tidak terjadi pembentukan asam (warna medium tidak berubah) setelah penambahan metil merah
- Uji VP (+), terjadi pembentukan asam (warna medium menjadi merah muda) setelah penambahan pereaksi Barrit
- Uji VP (-), tidak terjadi pembentukan asam (warna medium tidak berubah) setelah penambahan pereaksi Barrit
- Uji sitrat (+), perubahan warna medium menjadi biru
- Uji sitrat (-), tidak ada perubahan warna medium

(a) *E. coli* sampel 1 dan 2(b) *E. coli* sampel 3 dan *E. coli* ATCC 25922**Gambar 2 Hasil Uji Resistensi *E. coli* Isolat Klinik terhadap Ampisilin**

Hasil uji resistensi *E. coli* isolat klinik dan *E. coli* ATCC 25022 terhadap ampisilin terdapat pada Gambar 2 dan Tabel 2. Hasil uji menunjukkan bahwa *E. coli* sampel klinik 1 dan 2 merupakan galur resisten ampisilin, sedangkan *E. coli* sampel klinik 3 merupakan galur yang sensitif. Hasil amplifikasi gen bla

dari *E. coli* isolat klinik dengan metode PCR-koloni dan PCR-DNA dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil deteksi produk PCR-koloni dan PCR-DNA di bawah sinar UV λ 312 nm menggunakan alat transilluminator UV (Cole-Palmer) menunjukkan pita-pita DNA dari ketiga lubang yang sejajar dengan pita

**Gambar 3 Elektroforegram Produk PCR-Koloni dan PCR-DNA dari *E. coli* Isolat Klinik**

Keterangan:

Marka : Plasmid pUC19/HinfI

K(+) : Kontrol positif, plasmid pUC19 yang mengandung gen resisten ampisilin

A : Produk PCR-koloni dari *E. coli* isolat klinik 1

B : Produk PCR-DNA dari *E. coli* isolat klinik 1

C : Produk PCR-DNA dari *E. coli* isolat klinik 2

Tabel 3 Hasil Uji Resistensi *E. coli* Isolat Klinik terhadap Ampisilin

Bakteri	Diameter Hambat (mm)	Hasil
<i>E. coli</i> isolat 1	0	Resisten
<i>E. coli</i> isolat 2	0	Resisten
<i>E. coli</i> isolat 3	18	Sensitif
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19	Sensitif

DNA plasmid pUC19 sebagai kontrol positif. Ukuran pita-pita tersebut sekitar 200 pb. Analisis hasil migrasi produk PCR dari *E. coli* isolat klinik dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5. Berdasarkan data pada Tabel 2, dapat dihitung konstanta a dan b pada persamaan regresi linier $y = bx + a$, sehingga diperoleh persamaan $y = -0,61x + 4,01$. Berdasarkan hasil ekstrapolasi data pada Tabel 5, maka diketahui ukuran pita DNA dari produk PCR pada ketiga lubang pencadang adalah 199 pb.

Pembahasan

Koloni *E. coli* pada medium Mac Conkey berwarna merah dengan permukaan yang kering. Mac Conkey merupakan medium selektif dan diferensial karena mengandung zat warna kristal violet dan garam empedu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif sehingga hanya bakteri Gram negatif yang dapat tumbuh. Koloni *E. coli* berwarna merah karena mampu memfermentasikan laktosa dan menghasilkan asam yang mempermudah absorpsi neutral

red dalam medium tersebut ke dalam koloni.^{9,10}

Ketiga biakan memberikan hasil uji biokimia IMVIC yang sama, yaitu indol positif, uji MR positif, uji VP negatif dan uji sitrat negatif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri menghidrolisis triptofan menjadi indol dan mengoksidasi glukosa, akan tetapi tidak membentuk asam dan tidak dapat memfermentasi sitrat yang merupakan ciri dari *E. coli*.

Berdasarkan hasil uji resistensi dapat diketahui pertumbuhan koloni *E. coli* isolat 1 dan 2 tidak terganggu dengan kehadiran cakram antibiotik ampisilin sehingga tidak membentuk zona hambat. Hal ini menunjukkan keduanya merupakan bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin. *E. coli* isolat 3 merupakan galur yang sensitif terhadap ampisilin karena terbentuk diameter hambat sebesar 18 mm. Besarnya diameter hambat ini hampir sama dengan diameter hambat *E. coli* ATCC 25922, yaitu bakteri *E. coli* standar yang sensitif terhadap ampisilin. Diameter zona hambat teoritis untuk cakram ampisilin 10 µg terhadap bakteri dari keluarga

Tabel 4 Hasil Migrasi Marka DNA pUC19/Hinfl

Urutan pita DNA marka	pb	Y	X
1	1419	3,2	1,35
2	517	2,71	2,30
3	315	2,5	2,5
4	214	2,3	2,8

Keterangan:

pb : jumlah sekuens DNA (pb/pasangan basa)

y : log pb

x : jarak migrasi pita dari sumur pencadang (cm)

Tabel 5 Hasil Migrasi Produk PCR dari *E. coli* Isolat Klinik

Nomor Lubang Pencadang	X	Y
1	2,75	2,3
2	2,77	2,3
3	2,75	2,3

Keterangan:

pb : jumlah sekuens DNA (pb/pasangan basa)

y : log pb

x : jarak migrasi pita dari sumur pencadang (cm)

Enterobacteriaceae adalah resisten <13 mm, rata-rata 14-16mm, dan sensitif >17mm.

Amplifikasi dilakukan terhadap koloni maupun hasil isolasi DNA total dari *E.coli* isolat klinik. PCR koloni dilakukan sebagai langkah awal PCR untuk mengetahui keberadaan gen bla tanpa melakukan isolasi DNA total. Kelemahan metode ini adalah produk PCR dapat terganggu oleh adanya protein. Hal tersebut dapat diatasi dengan melakukan PCR-DNA, walaupun cara ini memerlukan langkah isolasi DAN total terlebih dahulu.

Amplifikasi gen bla dalam *E. coli* isolat klinik dilakukan dengan menggunakan sepasang primer khusus yang dapat mengenali gen ini.⁷ Proses amplifikasi hanya akan berjalan jika penempelan primer dilakukan menggunakan suhu *annealing* yang tepat. Penentuan suhu *annealing* harus dioptimasi dengan mempertimbangkan panjang, urutan, dan jenis dari oligonukleotida primer. Semakin banyak kandungan basa G dan C, maka akan semakin tinggi pula suhu yang diperlukan.

Berdasarkan hasil ekstrapolasi data pada Tabel 5, maka diketahui ukuran pita DNA dari produk PCR pada ketiga lubang pencadang adalah 199 pb. Ukuran ini sedikit berbeda dengan ukuran gen bla teoritis sebesar 200 pb.⁷ Ukuran pori yang besar pada gel agarosa tersebut menyebabkan pemisahan molekul-molekul dengan jumlah pasangan basa yang sedikit berbeda menjadi bias.

Simpulan

Hasil deteksi gen resistensi ampicillin (bla) pada *E. coli* isolat klinik dengan metode PCR-koloni maupun PCR-DNA menunjukkan bahwa gen ini menjadi penyebab terjadinya resistensi ampicilin pada bakteri *E. coli*. Hasil analisis migrasi produk PCR menunjukkan bahwa gen bla berukuran 199 pb. Resistensi ampicilin dapat mengakibatkan penyakit yang diderita semakin parah serta meningkatnya komponen biaya yang dikeluarkan oleh pasien. Diperlukan pemilihan antibiotik yang selektif dan rasional untuk mencegah resistensi ampicilin pada pasien dengan gejala sistitis.

Daftar Pustaka

1. Niranjana V, Malini A. Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients. *Indian J Med Research*. 2014;139(6):945.
2. Sanchez GV, Baird AMG, Karlowsky JA, Master RN, Bordon JM. Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *J Antimicrob Chemother*. 2014;dku282.
3. Irengbe LM, Kabego L, Vandenberg O, Chirimwami RB, Gala JL. Antimicrobial resistance in urinary isolates from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in South-Kivu Province

-
- (Democratic Republic of Congo). BMC Research Notes. 2014;7(1):374. doi:10.1186/1756-0500-7-374
4. Chen J, Jin M, Qiu ZG, Guo C, Chen ZL, Shen ZQ, et al. A survey of drug resistance bla genes originating from synthetic plasmid vectors in six Chinese rivers. Environmental Science & Technology. 2012; 46(24):13448–54. doi: 10.1021/es302760s
 5. Dallenne C, Costa AD, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2012;65:490–5. doi: 10.1093/jac/dkp498
 6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. Approved standard M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa; 2002.
 7. Persing DH, Tenover FC. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. ASM: Washington DC; 2004.
 8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual, Volume 1, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; 1989.
 9. Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an Escherichia coli O157: H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. Applied Environmental Microbiol. 2006;72(4):2564–72. doi: 10.1128/AEM.72.4.2564-2572.2006
 10. Wojnicz D, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Kicia M, Tichaczek-Goska D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic Escherichia coli. Urological Research. 2012;40(6):683–97. doi: 10.1007/s00240-012-0499-6