

PREVALENSI ISOLAT KLINIS *Pseudomonas aeruginosa* YANG MEMILIKI GEN *lasI* dan *lasR* DI RUMAH SAKIT UMUM PUSAT SANGLAH DENPASAR TAHUN 2013 – 2016

I G. A. Ngurah Aswin Panji Sanjaya^{1*}, Ni Nengah Dwi Fatmawati², Made Agus Hendrayana²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RS Sanglah

E-mail: panjiaswin12@gmail.com

ABSTRAK

Pseudomonas aeruginosa adalah kuman patogen oportunistik yang dapat menyebabkan infeksi yang invasif pada pasien dengan penyakit kritis maupun pasien yang memiliki tingkat imunitas yang sangat rendah seperti pasien neutropenia, luka bakar, atau *cystic fibrosis*. *P. aeruginosa* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan menimbulkan patogenitas. Salah satunya adalah biofilm. Biofilm membantu bakteri untuk bertahan hidup dalam kondisi yang buruk termasuk di permukaan alat medis dan resisten terhadap antibiotik. Pembentukan biofilm dipengaruhi oleh suatu sistem yang disebut sistem *Quorum Sensing* (QS). Sistem QS *P. aeruginosa* terdiri dari dua sistem yaitu sistem *las* (*lasIR*) dan *rhl* (*rhlIR*). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui prevalensi isolat klinis *P. aeruginosa* yang memiliki Gen *lasI* dan *lasR* di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2013 – 2016. Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional* dengan menggunakan 25 sampel yang diambil dari sputum (n=4; 16%), urin (n=8; 32%), pus (n=10; 40%) dan darah (n=3; 12%). Sebanyak 24 (96%) dari 25 isolat klinis *P. aeruginosa* memiliki gen *lasI* dan sebanyak 25 (100 %) isolat klinis memiliki gen *lasR*. Berdasarkan prevalensinya, dapat ditarik kesimpulan bahwa gen *lasI* dan *lasR* merupakan faktor virulensi mayor pada bakteri ini.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Quorum Sensing*, *lasI*, *lasR*, PCR

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogens that can cause invasive infections in patients with critical illness as well as patients with very low levels of immunity such as neutropenia, burns or cystic fibrosis. *P. aeruginosa* has many virulence factors that contribute on their pathogenicity. One of them is biofilm. Biofilm help bacteria to tolerate survival in adverse conditions including surfaces in medical facilities and resistance to antibiotics. Biofilm formation is affected by a system called *Quorum Sensing* (QS) system. *P. aeruginosa* QS system consists of two system there are *las* (*lasIR*) system dan *rhl* (*rhlIR*) system. The purpose of this research was to know the prevalence of clinical isolates of *P. aeruginosa* which have *lasI* and *lasR* Gene at Sanglah General Hospital Denpasar in 2013 - 2016. This is a descriptive with cross sectional study design with the sample of 25 clinical isolates from sputum (n=4; 16%), urine (n=8; 32%), pus (n=10; 40%) and blood (n=3; 12%). The result was 24 (96%) of 25 clinical isolates of *P. aeruginosa* had a *lasI* gene and 25 (100%) of the clinical isolates had *lasR* gene. Based on its prevalence, it can be deduced that the genes *lasI* and *lasR* is major virulence factors in this bacteria.

Keywords:: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Quorum Sensing*, *lasI*, *lasR*, PCR

PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen bagi manusia sehingga dapat menyebabkan berbagai infeksi dimana infeksi tersebut sulit untuk diobati karena *P. aeruginosa* adalah bakteri yang resisten terhadap sebagian besar antibiotik. Hal tersebut disebabkan oleh adanya biofilm pada bakteri *P. aeruginosa*.¹ Infeksi-infeksi yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* sering dihubungkan dengan sistem imun penderita yang rendah seperti neutropenia, luka bakar, atau *cystic fibrosis*.²

Berdasarkan data dari Lyczak dkk³ pada tahun 2000, *P. aeruginosa* pada umumnya menyebabkan infeksi jaringan lunak, infeksi saluran kencing, *bacterimia*, infeksi saluran pernapasan (pneumonia), *otitis externa*, *keratitis*, dan *otitis media folliculitis*. Pada dekade terakhir infeksi bakteri *P. aeruginosa* yang paling sering dikaitkan dengan *Healthcare associated infections* (HAIs).^{1,4}

Healthcare associated infections (HAIs) merupakan infeksi yang diperoleh selama masa perawatan di rumah sakit minimal 72 jam, yang disebabkan oleh invasi organisme pada jaringan, organ atau cairan tubuh yang disertai suatu gejala klinis baik lokal maupun sistemik.⁵ Kasus HAIs sudah banyak terjadi di berbagai rumah sakit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rasyid dkk⁶ didapatkan prevalensi angka kejadian HAIs pada pasien pasca laparatomi di Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) M. Djamil Padang pada tahun 2000 sebesar 14% dari 100 kasus (14 kasus).

Menurut Tennant dkk⁷, mikroorganisme patogen penyebab HAIs yang paling umum adalah *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, dan lain-lain. Selain itu, menurut data penelitian yang dilakukan di rumah sakit Dr. Moewardi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta tahun 2003, organisme utama yang menyebabkan HAIs meliputi *P.*

aeruginosa (13%), *Staphylococcus aureus* (12%), *Staphylococcus koagulase-negatif* (10%), *Candida* (10%), *Enterococci* (9%) dan *Enterobacter* (8%).⁸ Berdasarkan data-data tersebut disimpulkan bahwa *P. aeruginosa* merupakan salah satu penyebab yang paling sering menyebabkan HAIs.⁴

P. aeruginosa merupakan salah satu kuman yang sering ditemukan sebagai penyebab HAIs di rumah sakit khususnya di *Intensive Care Unit* (ICU). Hal tersebut sesuai dengan data Pola Bakteri dan Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotika di RSUP Sanglah Periode Juli – Desember 2014 yang dikeluarkan oleh Bagian/SMF Mikrobiologi Klinik FK Universitas Udayana-RSUP Sanglah, dimana bakteri *P. aeruginosa* adalah bakteri ketiga yang paling sering ditemukan pada ruang ICU, ICCU dan *Burn Unit*, setelah bakteri *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus*.⁹

Biofilm merupakan salah satu faktor virulensi dari *P. aeruginosa* yang menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik dimana pembentukannya dipengaruhi oleh sistem QS. Sistem QS terdiri dari dua sistem yaitu sistem *las* (*lasIR*) dan *rhl* (*rhlIR*).² Peningkatan pemahaman gen virulensi dan pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* dapat memfasilitasi pengembangan vaksin baru dan pemilihan pengobatan di masa depan. Selain itu menghambat virulensi bakteri tanpa membunuh patogen merupakan pendekatan anti-patogenik yang saat ini banyak dieksplorasi.⁴ Oleh sebab itu, penelitian ini berfokus untuk mencari prevalensi isolat klinis *P. aeruginosa* yang memiliki Gen *lasI* dan *lasR* di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2013 – 2016.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan desain *cross-sectional* yang dilakukan di Instalasi Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Penelitian ini dilakukan selama 8 (delapan)

bulan yaitu dimulai pada bulan April 2017 hingga November 2017. Teknik yang digunakan untuk penentuan sampel penelitian ini adalah *convenient purposive sampling* dimana isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang memenuhi kriteria inklusi dimasukan sebagai sampel, yaitu Isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang terisolasi dari spesimen klinis di Instalasi Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar pada Januari 2013 hingga Desember 2016 dan berasal dari satu pasien (*nonduplicative sample*). Isolat yang tidak terisolasi dari spesimen klinis dan tidak berasal dari satu pasien menjadi kriteria eksklusi dalam penelitian ini.

Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan nomor kajian etik 962/UN.14.2/KEP/2017

Isolasi DNA *Pseudomonas aeruginosa*

DNA diekstraksi dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang telah ditumbuhkan pada media agar MacConkey menggunakan metode *boiling* sederhana dan sekitar 5-10 koloni dipanen serta disuspensi pada 200 µl TE dengan pH 8. Suspensi dipanaskan pada suhu mendidih sekitar 100°C selama 10 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Supernatan sebesar 75 µl digunakan sebagai sumber dari cetakan untuk diamplifikasi.

PCR untuk Mendeteksi gen *lasI* dan *lasR* pada *Pseudomonas aeruginosa*

DNA *Pseudomonas aeruginosa* yang sudah didapatkan kemudian digunakan untuk PCR. Reaksi PCR dilakukan untuk mendeteksi gen *lasI* dan *lasR* dengan menggunakan primer spesifik

Forward: 5'-GTGTTCAAGGAGCGCAAAGG-

3'*Reverse:* 5'-

AACGGCTGAGTTCACAGATG -3' untuk gen *lasI* dan *Forward:* 5'-

TCGAACATCCGGTCAGCAAA-3'*Reverse:* 5'-

GTTACATTGGCTTCCGAGC -3' untuk

gen *lasR*.¹⁰ PCR dilakukan dengan menggunakan *Go Taq® Green Master Mix* pada campuran reaksi Mix PCR dengan volume total 10 µl yang mengandung mengandung 5 µl *Go Taq® Green Master Mix*, 0,3 µl primer spesifik dengan konsentrasi µM, 0,8 µl DNA polymerase dan 3,6 µl H₂O. Siklus PCR dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit; 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 50°C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik serta ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit.

Elektroforesis

Amplikon yang dihasilkan kemudian dielektroforesi pada 2% gel agarosa dalam *buffer TBE1x* pada kekuatan listrik sebesar 100 volt selama 35 menit. Selanjutnya, DNA divisualisasikan dengan pewarnaan *GelRed™ Nucleic Acid Gel*. Gen *lasI* dinyatakan positif jika ditemukan *band* pada 238 bp sedangkan Gen *lasR* dinyatakan positif jika ditemukan *band* pada 128 bp.¹⁰

Sequencing

Sequencing dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa pita amplikon yang diperoleh merupakan pita *lasI* dan *lasR* yang diharapkan. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan BigDye Terminator v3.1 Kit yang dilakukan di First Base (Malaysia). Hasil *sequencing* divisualisasi dan diedit dengan Mega version 7.0. Kemudian dibandingkan dengan data pada GenBank (www.ncbi.gov/BLAST).

HASIL

Sebanyak 25 isolat digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Isolat yang digunakan adalah isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang terisolasi dari spesimen klinis seperti spesimen sputum (n = 4), urin (n = 8), pus (n = 10), darah (n = 3). Seluruh sampel didapatkan dari Instalasi Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar pada tahun 2013 hingga 2016. Distribusi sampel berdasarkan tahun dapat dilihat pada **Table 1**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*, sehingga pengambilan data hanya dilakukan satu kali. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas

Kedokteran Universitas Udayana selama 2 bulan terhitung dari bulan Oktober hingga November 2017 untuk pengerjaan proses PCR.

Tabel 1. Distribusi sampel berdasarkan tahun

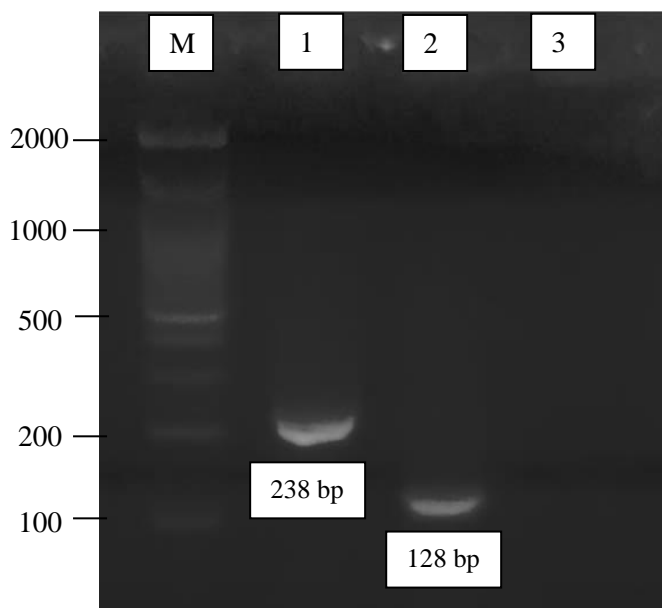
Jenis Sampel	Tahun				Jumlah (%)
	2013	2014	2015	2016	
Sputum	0	0	1	3	4 (16)
Urin	0	0	2	6	8 (32)
Pus	1	0	1	8	10 (40)
Darah	0	0	1	2	3 (12)
Jumlah (%)	1 (4)	0 (0)	5 (20)	19 (76)	25 (100)

Semua isolat klinis *P. aeruginosa* diidentifikasi melalui proses PCR dan diamplifikasi menggunakan primer spesifik (**Tabel 2**). Gen *lasI* dinyatakan positif jika pada elektroforesis hasil PCR ditemukan *band* pada 238 bp dan dinyatakan negatif jika pada elektroforeis hasil PCR tidak ditemukan *band* pada 238 bp. Sedangkan

Gen *lasR* dinyatakan positif jika pada elektroforesis hasil PCR ditemukan *band* pada 128 bp dan dinyatakan negatif jika pada elektroforeis hasil PCR tidak ditemukan *band* pada 128 bp. Tidak ada pita terbentuk di pita PCR untuk sampel dengan kontrol negatif (**Gambar 1**).

Tabel 2. Primer dan proses PCR dalam amplifikasi gen *lasI* dan *lasR*

Sekuens (5' – 3') ¹⁰	Proses PCR						
	Gen	Ukuran Amplikon	Pre-denaturasi	Denaturasi	Annealing	Ekstensi	Final Ekstensi
F: GTG TTC AAG GAG CGC AAA GG R: AAC GGC TGA GTT CCC AGA TG	<i>lasI</i>	238 bp	95 °C 2 menit	95 °C 30 detik	53°C 30 detik	72 °C 30 detik	72 °C 5 menit
F:TCGAACATCCGGTCA GCAAA R:GTTACATTGGCTTC CGAGC	<i>lasR</i>	128 bp	95 °C 2 menit	95 °C 30 detik	53°C 30 detik	72 °C 30 detik	72 °C 5 menit



Gambar 1. Amplifikasi PCR gen *lasI* dan *lasR* dengan suhu *annealing* 53°C. Lane M marker 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific GeneRuler) ; lane 1 gen positif *lasI* (238 bp); lane 2 gen positif *lasR*; lane 3 kontrol negatif H₂O.

Hasilnya ditemukan 24 isolat (96 %) dinyatakan positif memiliki gen *lasI* dan 25 isolat (100%) dinyatakan positif memiliki gen *lasR*. Semua isolat memiliki gen *lasR* sedangkan sebanyak 1 isolat dinyatakan negatif memiliki gen *lasI* setelah dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali yaitu sampel yang berasal dari urin (**Tabel 3**). Untuk mengkonfirmasi bahwa pita yang teramplifikasi merupakan segmen gen *lasI* dan *lasR* maka dilakukan *sequencing*. *Sequencing* dari produk PCR dikonfirmasi dengan BLAST (KR020726.1 untuk gen *lasI* dan LC193829.1 untuk gen *lasR*). Hasil *sequencing* produk PCR menunjukkan bahwa pita yang teramplifikasi merupakan segmen gen *lasI* dan *lasR*.

Tabel 3. Hasil PCR *P. aeruginosa* yang Terisolasi dari Spesimen Klinis di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah Tahun 2013-2016

Jenis Sampel	lasI		lasR		Jumlah (%)
	Positif	Negatif	Positif	Negatif	
Urin	7	1	8	-	8 (32)
Sputum	4	-	4	-	4 (16)
Pus	10	-	10	-	10 (40)
Darah	3	-	3	-	3 (12)
Total (%)	24 (96)	1 (4)	25 (100)	0 (0)	25 (100)

PEMBAHASAN

P. aeruginosa adalah kuman patogen oportunistik yang dapat menyebabkan infeksi yang invasif pada pasien dengan penyakit kritis maupun pasien yang memiliki tingkat imunitas yang sangat rendah seperti pasien neutropenia, luka bakar, atau *cystic fibrosis*.^{2,4} Bakteri ini hanya patogen ketika masuk ke daerah tanpa pertahanan normal, misalnya, ketika selaput lendir dan kulit terganggu oleh kerusakan jaringan langsung; ketika kateter intravena atau urin digunakan; atau ketika kondisi neutropenia, seperti pada

kemoterapi kanker.¹¹ Semua itu merupakan faktor predisposisi dimana setiap faktor tersebut mengakibatkan infeksi yang berbeda-beda.

Penelitian ini terfokus untuk mengidentifikasi salah satu faktor virulensi *P. aeruginosa* yaitu gen *lasI* dan *lasR* yang terdapat pada *Quorum Sensing*. *Quorum Sensing* merupakan salah satu mekanisme yang mempengaruhi pembentukan biofilm dimana ini akan menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik. *Quorum Sensing* adalah mekanisme sinyal sel yang digunakan oleh banyak spesies

sebagai respon terhadap sinyal ekstraseluler (*autoinducer*). *P. aeruginosa* memiliki dua sistem QS utama yang diregulasi oleh *autoinducers* *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs). Dua sistem QS tersebut adalah sistem *lasIR* dan sistem *rhlIR*. Selain mempengaruhi pembentukan biofilm, gen *lasI* dan *lasR* juga mempengaruhi faktor virulensi lain seperti LasB elastase, LasA protease, alkaline protease, dan exotoxin A.¹² Penelitian ini menunjukkan bahwa hampir semua isolat klinis *P. aeruginosa* memiliki gen *lasI* dan *lasR*. Prevalensi isolat klinis *P. aeruginosa* yang memiliki gen *lasI* sebesar 96 % dan yang memiliki gen *lasR* sebesar 100 %. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hemati dkk¹⁰ pada tahun 2014 di Iran. Penelitian tersebut menggunakan 140 isolat klinis yang nantinya akan dideteksi dengan metode PCR. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil yaitu prevalensi isolat klinis *P. aeruginosa* yang memiliki gen *lasI* dan *lasR* sebesar 93,57 % (131 isolat). Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa prevalensi isolat klinis *P. aeruginosa* yang memiliki gen *lasI* dan *lasR* sangat tinggi.¹⁰

Selain itu dalam penelitian tersebut juga mencari hubungan antara pembentukan biofilm dengan *Quorum Sensing*. Pembentukan biofilm pada isolat dilakukan dengan metode mikroplate. Hasilnya sebanyak 87,15 % (122 isolat) isolat klinis yang membentuk biofilm sedangkan 12,85 % (18 isolat) lainnya tidak memproduksi biofilm. Dari hasil tersebut didapatkan bahwa adanya hubungan yang signifikan antara *Quorum Sensing* dengan pembentukan biofilm.¹⁰

Hal menarik lainnya yang ditemukan pada penelitian ini adalah satu sampel yang dinyatakan negatif terhadap gen *lasI*. Hal yang dapat menjelaskan bahwa pembentukan biofilm tidak hanya dipengaruhi oleh gen *lasI*, namun juga dipengaruhi oleh gen lain seperti gen *rhlI* dan *rhlR*¹² serta dipengaruhi oleh

konsentrasi besi di lingkungan, dan kondisi nutrisi.¹³ Penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengklarifikasi temuan ini.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, 24 (96%) dari 25 isolat klinis *P. aeruginosa* dari Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah memiliki gen *lasI* dan sebanyak 25 (100 %) isolat klinis memiliki gen *lasR*. Satu sampel lainnya dinyatakan negatif terhadap gen *lasI*. Berdasarkan prevalensinya, dapat ditarik kesimpulan bahwa gen *lasI* dan *lasR* merupakan faktor virulensi mayor pada bakteri ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar telah memberi dukungan, dan Wahyu Hidayanti selaku staf Instalasi Biologi Molekuler serta Ni Wayan Nilawati selaku staf di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah telah membantu secara teknis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Girard, G., & Bloemberg, G. V. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. 2008; 3, 97–106.
2. S.L. Gellatly & R.E.W. Hancock. Minireview *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Centre for Microbial Diseases and Immunity Research 67:2013; 159–173.
3. Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbiol Infect 2: 2000; 1051–1060.
4. Slama, Karim B, Skander G, Ahlem J, Meriem M, Chedlia F, dkk. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit and

- otolaryngology department of a tunisian hospital. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(19):1.
5. Mardiaty, R. PEDOMAN Pelayanan Pusat Sterilisasi (CSSD) di Rumah Sakit. Jakarta: Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI Direktorat Jenderal Pelayanan Medik. 2001; pp. 37.
 6. Rasyid, Roslaili dan Suhelmi K. Prevalensi Infeksi Nosokomial Pasien Pasca Sectio Sesarea pada Bagian Obgyn RSUP Dr. M. Djamil Padang. Bagian Mikrobiologi FK Unand. Padang. 2000.
 7. Tennant, I., Harding, H. Microbial Isolates from Patients in An Intensive Care Unit, and Associated Risk Factors. West Indian Medical Journal. 2005: Vol. 54, No. 4.
 8. Guntur, A. The Role of Cefepime: Empirical Treatment in Critical Illness. Dexa-medica journal. 2007.
 9. Sri Budayanti dkk. Pola Bakteri dan Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotika di RSUP Sanglah Periode Juli-Desember 2014. Bagian/SMF Mikrobiologi Klinik FK Unud-RSUP Sanglah. Denpasar. 2015; pp. 25-27.
 10. Hemati dkk. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J. Microbiology. 2014; 6 (3) :133-139.
 11. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. Medical Microbiology. 24th Edition. USA: McGraw-HillCompanies. 2007; pp. 263-264.
 12. Christian van Delden. Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Plenum Publishers New York 2.2004; 22-26
 13. Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A., Davies, D.G., and Gilbert, P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAOI biofilm. J Bacteriol 186.2004: 7312-7326.