

# Uji Kepekaan Antimikroba dengan Metode Otomatis dan Metode Molekular

Donaliazarti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium RSUD Lubuk Sikaping, Pasaman, Sumbar

\*E-mail : donaliazarti@gmail.com

## Abstrak

Uji kepekaan antimikroba penting untuk mengonfirmasi kepekaan mikroorganisme terhadap antimikroba empiris yang telah dipilih atau untuk mendeteksi adanya resistensi pada isolat tersebut. Tujuan utama uji kepekaan antimikroba adalah membantu klinisi memilih antimikroba paling tepat untuk terapi. Uji kepekaan antimikroba juga digunakan untuk mengevaluasi aktivitas *in vitro* antimikroba baru. Metode otomatis dengan menggunakan alat telah banyak dikembangkan untuk mempermudah pemeriksaan uji kepekaan antimikroba dan yang direkomendasikan FDA adalah Vitek 2 System, MicroScan Walk Away, BD Phoenix Automated Microbiology System, dan Sensititre ARIS 2X. Metode molekular dikembangkan untuk mengonfirmasi resistensi antimikroba pada isolat dan deteksi langsung resistensi tersebut dalam spesimen klinis. Pemeriksaan dilakukan dalam rentang waktu lebih singkat sehingga dapat memberikan informasi lebih cepat. Metode molekular yang digunakan untuk mendeteksi gen resisten adalah *nucleic acid based technology* yang terdiri dari hibridisasi dan amplifikasi menggunakan teknik PCR. *Real time polymerase chain reaction* adalah teknik PCR yang menggunakan *molecular beacon* dan sudah diterapkan untuk identifikasi serta deteksi resistensi pada MRSA, VMRSA, dan *Mycobacterium tuberculosis* resisten rifampisin.

**Katakunci** — Uji kepekaan antimikroba, Metode Otomatis, Metode Molekular

## Abstract

*The antimicrobial susceptibility test is important to confirm the sensitivity of the microorganism to the selected empirical antimicrobial or to detect resistance in the isolate. The main goal of antimicrobial susceptibility testing is to assist clinicians choose the most appropriate antimicrobial for therapy. Antimicrobial susceptibility assays are also used to evaluate invitro activity of new antimicrobials. Automatic methods using tools have been developed to facilitate the examination of antimicrobial sensitivity tests and those recommended by the FDA are the Vitek 2 System, MicroScan Walk Away, BD Phoenix Automated Microbiology System, and Sensititre ARIS 2X. Molecular methods were developed to confirm antimicrobial resistance in isolates and to directly detect this resistance in clinical specimens. Examinations are carried out in a shorter span of time so that they can provide information more quickly. The molecular method used to detect resistant genes is nucleic acid based technology which consists of hybridization and amplification using PCR techniques. Real time polymerase chain reaction is a PCR technique that uses molecular beacons and has been applied for identification and detection of resistance to MRSA, VMRSA, and rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis.*

**Keywords**— *Antimicrobial susceptibility test, Automatic methods, Molecular method*

## I. PENDAHULUAN

Uji kepekaan antimikroba dilakukan pada mikroba penyebab penyakit yang sifat kepekaannya belum dapat diprediksi. Uji tersebut juga diindikasikan untuk spesies mikroba yang mampu berkembang menjadi resisten terhadap berbagai jenis antimikroba (CLSI, 2012a; CLSI, 2012b). Hasil uji kepekaan antimikroba akan memberikan pedoman kepada klinisi dalam memilih terapi paling tepat (Collins *et al.*, 2004).

Beberapa metode dapat digunakan untuk melakukan uji kepekaan antimikroba secara *in vitro*. Metode pemeriksaan yang sudah distandarisasi oleh CLSI di antaranya metode difusi cakram (CLSI, 2012a), *broth dilution method*, dan *agar dilution method* (CLSI, 2012b). Metode pemeriksaan terus diperbarui dengan mengembangkan berbagai alat otomatis yang dapat memberikan hasil lebih cepat (Jorgensen & Ferraro, 2009). Metode molekular juga dikembangkan untuk mengonfirmasi resistensi antimikroba pada isolat dan deteksi langsung resistensi tersebut dalam spesimen klinis (Fluit & Schmitz, 2001).

## II. Tinjauan Pustaka

### 1. ALAT OTOMATIS

Penggunaan alat otomatis dalam uji kepekaan antimikroba memberikan hasil lebih singkat dibandingkan manual karena sistem optik lebih sensitif dalam mendeteksi perubahan pertumbuhan bakteri. Food and Drug Administration sudah menyetujui empat alat otomatis untuk dipakai di Amerika Serikat (Jorgensen & Ferraro, 2009).

### Prinsip Pemeriksaan

#### A. MicroScan

MicroScan menggunakan *microdilution tray* terstandarisasi yang diinokulasi secara

manual kemudian diinkubasi di dalam alat. Alat akan memeriksa secara periodik menggunakan fluorometer atau turbidimeter untuk mendeteksi adanya pertumbuhan. MicroScan dapat memeriksa 40-96 *microdilution tray* (Gambar 1). Panel pemeriksaan yang menggunakan zat fluorogenik dapat dibaca dalam 3,5–7 jam. Panel pemeriksaan yang menggunakan prinsip turbidimetrik dapat dibaca dalam 4,5–18 jam (Felmingham & Brown, 2001; FDA, 2003; Jorgensen & Ferraro, 2009; Siemens, 2014).



GAMBAR 1. MICROSCAN (SIEMENS, 2014)

#### B. BD Phoenix Automated Microbiology System

Alat ini dapat memeriksa 100 panel secara bersamaan. Masing-masing panel terdiri dari 85 *well* untuk uji kepekaan antimikroba dengan salah satu *well* digunakan untuk kontrol. Setiap panel mengandung beberapa antimikroba dengan tingkat pengenceran konsentrasi sebesar dua kali lipat. Panel diinokulasi manual dan dimasukkan ke dalam alat. Phoenix memantau pertumbuhan setiap 20 menit dengan metode turbidimetrik dan kolorimetrik (indikator oksidasi-reduksi) (Gambar 2). Panel pemeriksaan yang tersedia di antaranya untuk bakteri negatif Gram, positif Gram di antaranya stafilokokus, enterokokus, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus β hemolytic* dan

*Streptococcus viridans*. Hasil akan diperoleh dalam waktu 6 – 16 jam (Wiles *et al.*, 1999; Becton, 2004; Jorgensen & Ferraro, 2009).



GAMBAR 2. BD PHOENIX AUTOMATED MICROBIOLOGY SYSTEM (WILES ET AL.,1999)

### C. Vitex 2 System

Alat ini berbentuk kartu plastik yang dihubungkan secara kapiler dengan suspensi bakteri uji sehingga dapat lewat dan menginokulasi *well*. Vitex 2 system mampu melakukan 30-240 pemeriksaan sekaligus yang masing-masing panel terdiri dari 64 *well* (Felmingham & Brown, 2001; Jorgensen & Ferraro, 2009). Metode ini menggunakan konsentrasi antimikroba dengan kenaikan dua kali lipat dan mengukur MIC dengan interval 20 menit dengan prinsip turbidimetri (Gambar 3) (Pincus, 2005). Bakteri negatif Gram yang cepat tumbuh, bakteri aerob negatif Gram, *S. pneumoniae* dapat diperiksa dalam waktu 4-10 jam (Jorgensen & Ferraro, 2009).



GAMBAR 3. VITEX 2 SYSTEM (PINCUS, 2005)

### D. Sensititre ARIS 2X

Sensititre ARIS 2X mampu memeriksa 64 panel dan setiap panel terdiri dari 96 *well microdilution* yang diinokulasi dengan *autoinoculator*. Pertumbuhan ditentukan dengan adanya fluoresensi setelah inkubasi 18-24 jam (Gambar 4). Panel pemeriksaan yang tersedia di antaranya untuk bakteri negatif Gram, positif Gram, *S. pneumoniae*, *Haemophilus sp*, dan batang negatif Gram nonfermentasi (Felmingham & Brown, 2001; Jorgensen & Ferraro, 2009; Thermoscientific, 2012).



GAMBAR 4. SENSITITRE ARIS 2X (THERMOSCIENTIFIC, 2012)

### Interpretasi

Alat secara otomatis membaca *well* terakhir yang masih jernih sebagai MIC. *Minimum inhibition concentration* akan dibagi ke dalam tiga kriteria (sensitif, intermediet, resisten) sesuai dengan jenis antimikroba dan bakterinya berdasarkan CLSI (Becton, 2004).

### 2. METODE MOLEKULAR

Metode molekular dapat mendeteksi mekanisme resistensi yang sudah diketahui dan yang belum diketahui tetapi memiliki homologi DNA yang memungkinkan penempelan primer atau *probe* (Woodford & Sundsfjord, 2005). Pemeriksaan dapat dilakukan dalam belum diketahui tetapi memiliki homologi DNA dibandingkan

konvensional sehingga dapat memberikan informasi lebih cepat (Fluit & Schmitz, 2001; Fluit *et al.*, 2001).

Metode molekular yang digunakan untuk mendeteksi gen resisten adalah *nucleic acid based technology*. Aplikasi teknik ini terutama bermanfaat untuk bakteri yang tumbuh lambat atau yang sulit dikultur. *Nucleic acid based technology* dapat diklasifikasi menjadi sistem hibridisasi dan amplifikasi dengan teknik PCR (Fluit *et al.*, 2001).

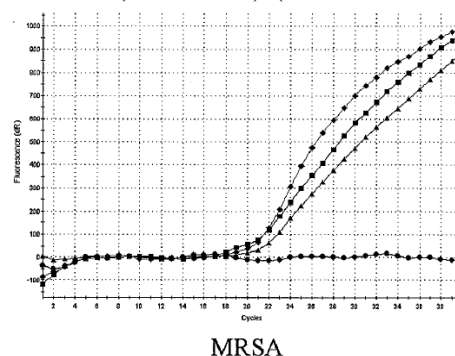
### Prinsip Pemeriksaan

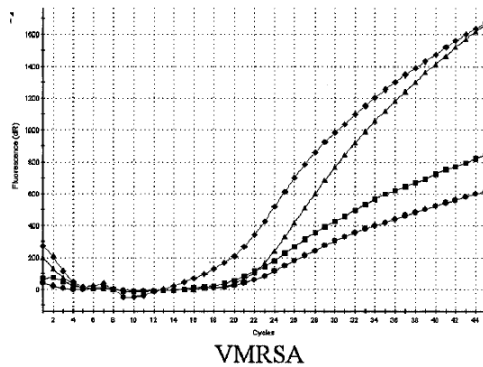
*Polymerase chain reaction* adalah teknik amplifikasi DNA menggunakan enzim DNA polimerase dan primer berupa oligonukleotida. *Polymerase chain reaction* terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi, *annealing* primer, dan elongasi. Setiap siklus dapat memperbanyak DNA target sebanyak dua kali lipat. Hibridisasi adalah teknik deteksi sekuens DNA tertentu berdasarkan kemampuan basa nitrogen asam nukleat untuk berpasangan, basa sitosin dengan guanin dan adenin dengan timin. Sampel DNA diubah menjadi untai tunggal dan bagian yang sesuai akan menempel pada *probe* (Fluit *et al.*, 2001; Marras *et al.*, 2006).

*Real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) adalah teknik PCR yang menggabungkan proses amplifikasi dan hibridisasi menggunakan *probe* yang dilabel yaitu *molecular beacon*. *Molecular beacon* adalah *hairpin-shape oligonucleotide probe*, di satu sisi memiliki *fluorophore* dan di sisi lain memiliki *quencher* yang menghambat fluoresensi. Hal ini terjadi ketika tidak terdapat molekul target dan kedua sisi berdekatan. *Molecular beacon* akan berubah strukturnya jika terdapat molekul target; *fluorophore* dan *quencher* akan berjauhan sehingga menghasilkan fluoresensi (Gambar 3.13) (Fluit *et al.*, 2001; Kubista *et al.*, 2006; Marras *et al.*, 2006).

Jumlah produk (*amplicon*) yang dibentuk selama reaksi RT-PCR dipantau dengan *probe* yang berfluoresensi. Jumlah *amplicon* tersebut akan sebanding dengan tingkat fluoresensi. Jumlah siklus amplifikasi yang dibutuhkan sampel untuk menghasilkan fluoresensi yang dapat dideteksi disebut *cycle threshold (CT) value*. Jumlah DNA awal mikroba yang terdapat dalam sampel dapat diperkirakan berdasarkan *CT value*. Sampel yang digunakan bisa berasal dari isolat bakteri ataupun dari spesimen langsung (Cepheid, 2009; Kubista *et al.*, 2006).

*Polymerase chain reaction* telah menjadi baku emas untuk pemeriksaan resistensi pada *methicillin resistant staphylococcus aureus* (MRSA) karena prevalensinya yang meningkat di berbagai negara saat ini sehingga diperlukan metode cepat untuk mendeteksi *carier* dan mengontrol penyebarannya (Woodford & Sundsfjord, 2005). *Real time polymerase chain reaction* dilakukan untuk identifikasi dan deteksi resistensi pada (MRSA) dan *vancomycin resistant MRSA* (VMRSA) dengan menggunakan beberapa *probe* yaitu *probe* untuk gen *SG16S* (gen spesifik untuk genus *Staphylococcus*), gen *spa* (gen untuk *Staphylococcus aureus*), gen *mecA* (gen resisten terhadap *methicillin*), dan gen *vanA* (gen resisten terhadap *vancomycin*). *Probe* akan menempel pada sekuens DNA yang sesuai jika pada sampel mengandung gen tersebut (Gambar 5) (Sinsimer *et al.*, 2005).

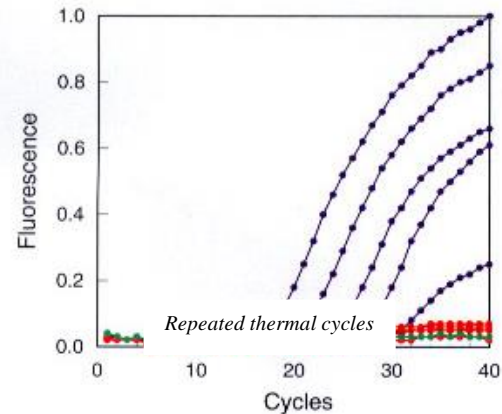




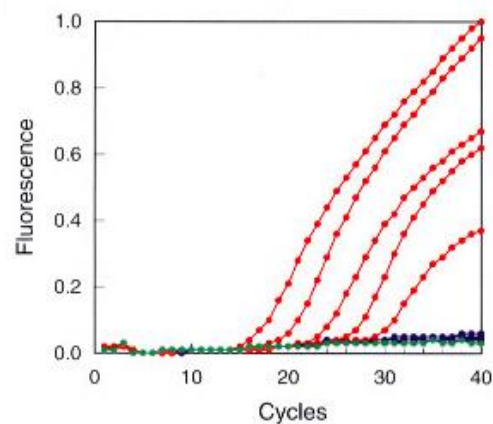
**GAMBAR 5. IDENTIFIKASI SPESIES DAN DETEKSI RESISTENSI PADA MRSA DAN VMRSA. (SIMBOL: KOTAK, MECA, SEGITIGA, SPA; WAJIK, SG16S; BULAT, VANA) (SINSIMER ET AL., 2005)**

Real time polymerase chain reaction juga diterapkan untuk identifikasi dan deteksi resistensi *M. tuberculosis* resisten rifampisin yang berhubungan dengan core region gen *rpoB* (Piatek *et al.*, 1998; Cepheid, 2009). Hal ini disebabkan kultur dan uji kepekaan antimikroba *M. tuberculosis* membutuhkan waktu yang cukup lama. Pemeriksaan RT-PCR pada *M. tuberculosis* bisa dilakukan dengan dua cara yaitu (Gambar 6) (Piatek *et al.*, 1998):

- a. Menggunakan probe yang sesuai dengan core region gen *rpoB* yang sensitif (*wild type strain*). Sampel yang mengandung *wild type strain M. tuberculosis* akan berfluoresensi sedangkan sampel yang mengandung strain resisten (*mutant H526Y*) tidak berfluoresensi.
- b. Menggunakan probe yang sesuai dengan core region *rpoB* yang resisten (*mutant H526Y*). Sampel yang mengandung *wild type strain M. tuberculosis* tidak akan berfluoresensi sedangkan sampel yang mengandung strain resisten (*mutant H526Y*) akan berfluoresensi.



(a)



(b)

**GAMBAR 6. HASIL PENGUKURAN RT-PCR PADA AMPLICON RPOB DARI WILD TYPE STRAIN *M. TUBERCULOSIS* (BIRU), MUTANT H526Y (MERAH), KONTROL NEGATIF (HIJAU). SAMPEL DENGAN PENGECERAN 10 KALI LIPAT DIPERIKSA (107 SAMPAI 103 DARI KIRI KE KANAN). (A) PROBE MENEMPEL PADA WILD TYPE STRAIN *M. TUBERCULOSIS*, (B) PROBE MENEMPEL PADA MUTANT H526Y (PIATEK ET AL., 1998)**

### Interpretasi

Interpretasi RT-PCR ada dua yaitu (Piatek *et al.*, 1998; Marras *et al.*, 2006):

- a. Intensitas fluoresensi yang muncul pada nilai CT yang kecil menunjukkan jumlah DNA awal mikroba yang banyak dalam sampel dan sebaliknya intensitas fluoresensi yang muncul pada nilai CT yang besar menunjukkan jumlah DNA awal mikroba yang sedikit dalam sampel.
- b. Gen resisten ditunjukkan melalui ada tidaknya fluoresensi sesuai dengan probe yang digunakan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- [1]. Becton D & Company, 2004, Laboratory Procedure : BD Phoenix™ PMIC/ID Panels, BD Phoenix™ PMIC Panels, BD Phoenix™ PID Panels, diunduh dari [www.bd.com](http://www.bd.com), dilihat tanggal 25/7/2014.
- [2]. Cepheid, 2009, Xpert MTB/RIF, diunduh dari [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com), dilihat tanggal 20/8/2014.
- [3]. CLSI, 2012a, Performance Standards for Antimicrobial Disk Test For Susceptibility Testing-Approved Standard, Eleventh Edition, diunduh dari [www.clsi.org](http://www.clsi.org), dilihat tanggal 10/5/2023.
- [4]. CLSI, 2012b, Methods for Dilution Antimicrobial Test For Bacteria That Grow Aerobically-Approved Standard, Ninth Edition, diunduh dari [www.clsi.org](http://www.clsi.org), dilihat tanggal 10/5/2023.
- [5]. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO, 2004, Antimicrobial Susceptibility Test in *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, Eighth Edition, USA: Oxford University Press, pp: 168-85.
- [6]. FDA, 2003, 510(k) Summary FDA: MicroScan Synergies Plus Gram Negative MIC/Combo Panels, diunduh dari [www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov) dilihat tanggal 4/8/2014.
- [7]. Felmingham D & Brown DFJ, 2001, Instrumentation in Antimicrobial Susceptibility Testing, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (S10): 81-5.
- [8]. Fluit AC & Schmitz FJ, 2001, The Use of Molecular Techniques to Detect Antimicrobial Resistance in Clinical Bacterial Isolates, *Microbiology Today*, diunduh dari <https://uqu.edu.sa>, dilihat tanggal 6/5/2023.
- [9]. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ, 2001, Molecular Detection of Antimicrobial Detection, 14 (4): 836-71.
- [10]. Jorgensen JH & Ferraro MJ, Antimicrobial Susceptibility Testing: A review of General Principles and Contemporary Practices, Editor; Reller LB & Weinstein MP, *Infectious Diseases Society of America*, pp: 1749-55.
- [11]. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K *et al.*, 2006, Review The Real Time Polymerase Chain Reaction, *Molecular Aspect of Medicine*, 27: 95-125.
- [12]. Marras SAE, Tyagi S, Kramer FR, 2006, Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes, *Clinica Chimica Acta*, 363:48-60.
- [13]. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, Telenti A, Miller LP, Kramer FR *et al.*, 1998, Molecular Beacon Sequence Analysis for Detecting Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Nature Biotechnology*, 16: 359-62  
Thermoscientific, 2012, Thermo Scientific Sensititre: Susceptibility and Identification System, diunduh dari [www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com), dilihat tanggal 26/7/2014.
- [14]. Pincus DH, 2005, Microbial Identification Using The Biomerieux Vitek 2 System in *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods Volume 2*, Editor: Miller MJ.
- [15]. Siemens, 2014, MicroScan Microbiology System, diunduh dari [www.siemens.com](http://www.siemens.com) dilihat tanggal 4/8/2014.
- [16]. Sinsimer D, Leekha S, Park S, Marras SAE, Koreen L, Willey B *et al.*, 2005, Use of A Multiplex Molecular Beacon Platform for Rapid Detection Methicillin and Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9): 4585-91.
- [17]. Wiles T, Turner D, Brasso WB, Hong J, Reuben J, 1999, Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing in Phoenix™, *American Society for Microbiology*, diunduh dari [www.bd.com](http://www.bd.com), dilihat tanggal 24/7/2014.
- [18]. Woodford N & Sundsfjord A, 2005, Molecular Detection of Antibiotic Resistance: When and Where? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 259-61.