HALAMAN PENGESAHAN

Judul	: Eksistensi gen karbapenemase dan identifikasi berbasis molekular jenis Acinetobacter yang resisten terhadap Karbapenem dari sampel klinis
Peneliti/Pelaksana	
Nama Lengkap	: MAULIN INGGRAINI, M.Si
Perguruan Tinggi	: STIKES Mitra Keluarga
NIDN	: 0303108901
Jabatan Fungsional	: Asisten Ahli
Program Studi	: Analis Kesehatan
Nomor HP	: 081296473661
Alamat surel (e-mail)	: molinmool@gmail.com
Anggota (1)	
Nama Lengkap	: SITI NURFAJRIAH M.Si
NIDN	: 0324128503
Perguruan Tinggi	: STIKES Mitra Keluarga
Anggota (2)	
Nama Lengkap	: NOOR ADRYAN ILSAN S.Pd, M.Si
NIDN	: 0308059101
Perguruan Tinggi	: STIKES Mitra Keluarga
Institusi Mitra (jika ada)	
Nama Institusi Mitra	: -
Alamat	: -
Penanggung Jawab	: -
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp 19,835,000
Biaya Keseluruhan	: Rp 19,835,000

Mengetahui,
Ketua PPPM

(AFRINIA EKA SARI, S.TP, M.Si)
NIP/NIK 15081608

Bekasi, 8 - 12 - 2020
Ketua,

(MAULIN INGGRAINI, M.Si)
NIP/NIK 14050108

Menyetujui,
Ketua STIKes Mitra Keluarga

(Dr. SUSI HARTATI, S.Kp., M.Kep., Sp.Kep.An)
NIP/NIK 95080501

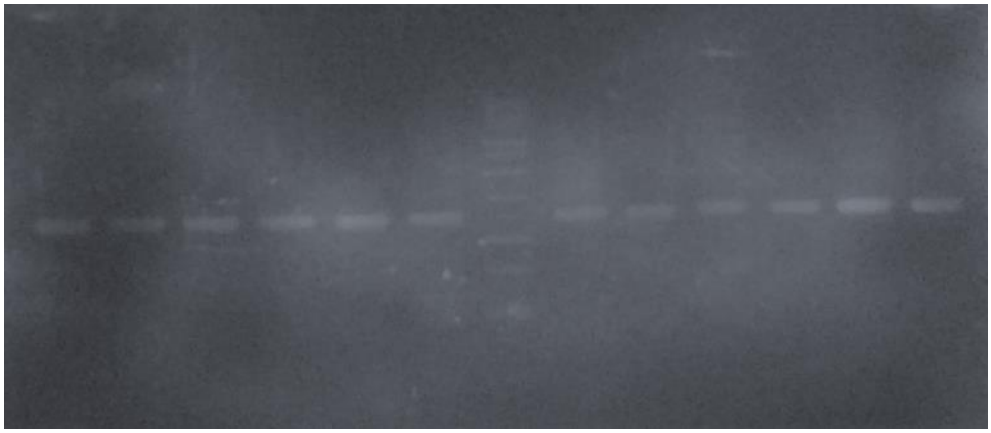
Scanned by CamScanner

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan seringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. **HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Karbapenem termasuk ke dalam antibiotik lini terakhir yang digunakan untuk mengatasi bakteri *Multi Drug Resisten* (MDR)[1]. Seiring dengan meningkatkan penggunaan karbapenem, maka semakin banyak bakteri dari sampel klinis yang resisten terhadap karbapenem. Bakteri resisten karbapenem yang digunakan pada penelitian ini adalah berasal dari sampel pasien di RS Mitra Keluarga Bekasi Timur. Pengumpulan bakteri berkisar dari bulan Februari – Juni 2020. Sampel bakteri yang didapatkan berjumlah 12 bakteri dengan rincian 5 bakteri *Acinetobacter baumanii*, 4 bakteri *Klebsiella pneumoniae*, 2 bakteri *Escherichia coli* dan 1 bakteri *Enterobacter cloa complex.* Isolat bakteri yang didapat dari rumah sakit dilakukan sub kultur pada media Tryptic Soy Agar (TSA). Isolasi DNA dilakukan pada kultur bakteri berumur 24 jam. Ekstraksi DNA disesuaikan dengan protokol Promega Wizard ® Genomic DNA Purification Kit (USA). Gen penyandi 16S rRNAdiamplifikasi menggunakan primer 1387r (5′-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3′) dan primer 63f (5′-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3′)[2] dengan hasil amplikon ~1300 pb. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi yaitu pra-denaturasi 94 ^{o}C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 ^{o}C selama 30 detik, annealing pada 55 ^{o}C selama 45 detik, elongasi pada 72 ^{o}C selama 1 menit 45 detik, dan post elongasi 72 ^{o}C 10 menit. Visualisasi amplikon dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5 % dan diamati dibawah UV transluminator. Gen 16S rRNA pada 12 isolat bakteri telah berhasil diamplifikasi menghasilkan pita tunggal; berukuran 1,3 kb.

AB27 AB32 AB46 A53 AB91 EC133 M EC143 En1 KP1 KP17 KP18 KP4

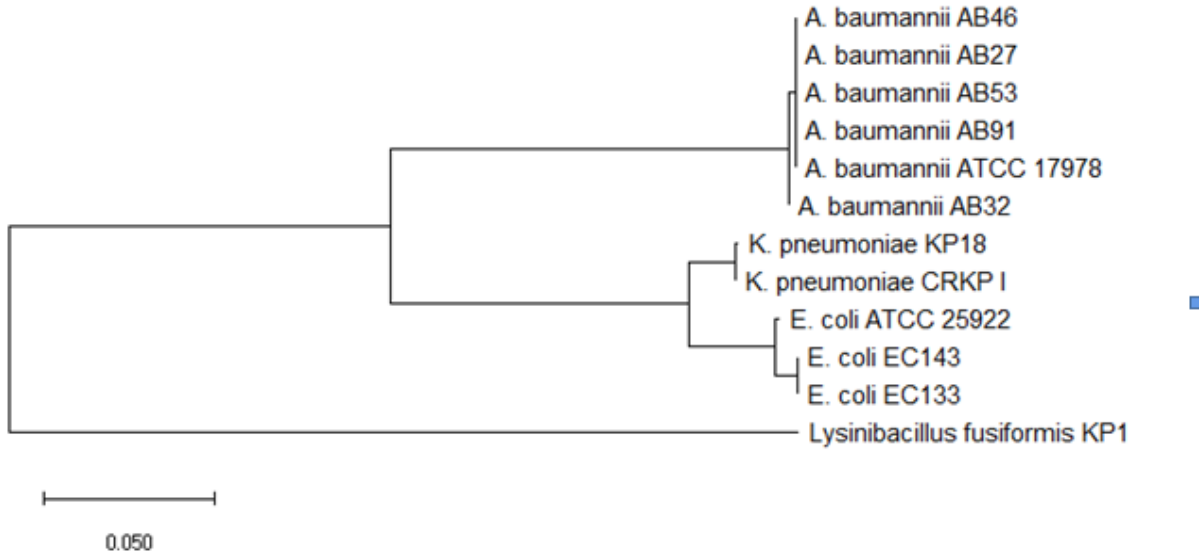


Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR menggunakan gen 16S rRNA dengan primer 63f dan 1387r; M = marker ladder; hasil amplikon rata-rata berukuran 1500 pb

Sekuen parsial gen 16S rRNA dibandingkan dengan sekuen gen 16S rRNA pada NCBI *database* (Tabel 1). Hasil BLAST menunjukkan bahwa sekuen parsial gen 16S rRNA beberapa isolat bakteri memiliki kemiripan dengan *Lysinibacillus fusiformis, Klebsiella pneumonia, Acinetobacter baumannii,* dan *Escherichia colii.*

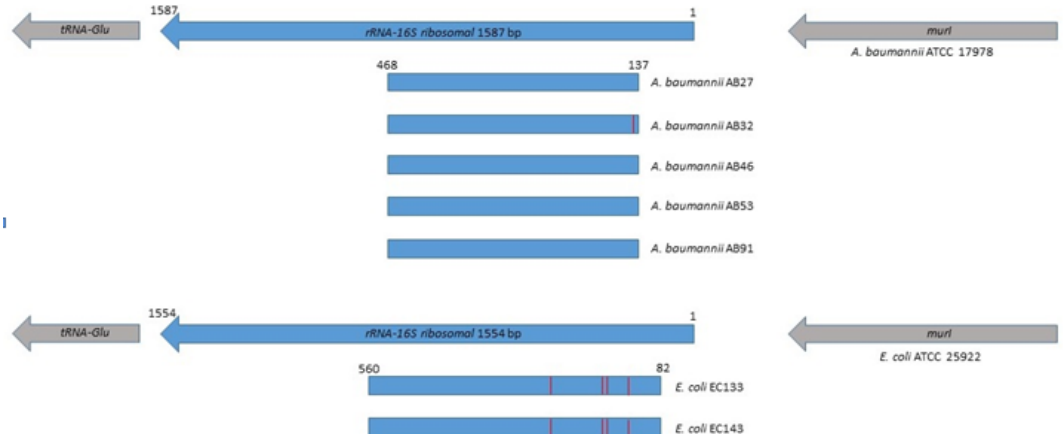
Tabel 1. Hasil pensejajaram sekuen gen 16S rRNA beberapa isolate terhadap data yang tersedia di NCBI berdasarkan BLASTX

No	Isolate	Description	Max score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	Sequence length (% coverage of full length)	Accession no.
1	KP1	*Lysinibacillus fusiformis* strain SKTU8	634	100	1e-177	97.57	370 bp (23.8%)	MK652860.1
2	KP18	*Klebsiella pneumoniae* strain IGM6-9	1711	100	0.0	99.79	933 bp (60%)	MT197279.1
3	AB27	*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978	1814	100	0.0	100	982 bp (61.9%)	CP053098.1
4	AB32	*Acinetobacter baumannii* strain rY22	1808	100	0.0	99.9	982 bp (61.9%)	MN173901.1
5	AB46	*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978	1814	100	0.0	100	982 bp (61.9%)	CP053098.1
6	AB53	*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978	1814	100	0.0	100	982 bp (61.9%)	CP053098.1
7	AB91	*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978	1814	100	0.0	100	982 bp (61.9%)	CP053098.1
8	EC133	*Escherichia coli* strain 192	1631	99	0.0	99.89	886 bp (57%)	MH671478.1
9	EC143	*Escherichia coli* strain 192	1631	99	0.0	99.89	886 bp (57%)	MH671478.1
10	En1	*Enterobacter cloacae*strain Uyi_27	1705	100	0.0	99.78	929 bp	MT507220.1



Gambar 2. Pohon filogenetik yang menggambarkan kedekatan isolat terhadap bakteri lain dalam satu clade maupun clade lain. Konstruksi berdasarkan metode *Neighbor Joining Tree* dengan nilai bootstrap 500x.

Berdasarkan data di atas menunjukkan bahwa isolat KP1 diidentifikasi sebagai *K. pneumoniae* di Vitek2, hasil BLAST menunjukkan memiliki kemiripan dengan 97,6% *Lysinibacillus fusiformis*. Isolat AB sebanyak 5 isolat diidentifikasi sebagai *Acinetobacter baumannii* di Vitek2. Hasil BLAST menunjukkan kemiripan sebesar 100% dengan *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. Analisis nukleotida menunjukkan EC143 dan EC133 identik dengan strain referensi *E.coli* ATCC25922 meskipun memiliki 4 perbedaan nukleotida (gambar 3).



Gambar 3. Hasil BLASTN 16s rRNA *A. baumannii* and *E. coli*. Urutan disejajarkan dan dibandingkan dengan strain referensi database NCBI. Tanda merah menunjukkan variasi nukleotida.

Acinetobacter baumannii dikenal sebagai penyebab utama infeksi bakteri di seluruh dunia, hampir 1.000.000 kasus setiap tahun diman 50% diantaranya resisten terhadap antibiotic termasuk karbapenem[3]. (Spellberg & Rex, 2013). *Acinetobacter baumannii* yang resistem terhadap karbapenem dikaitkan sebagai pathogen nosokomial[4]. Mekanisme resistensi karbapenem dari bakteri ini diantarnya menghasilkan karbapenemase kelompok OXA-15, pembuangan aktif, dan penurunan permeabilitas membrane luar[5].

D. **STATUS LUARAN**: Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta mengunggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas.

Luaran wajib yang dijanjikan adalah accpeted pada jurnal nasional terakreditasi peringkat 1-6, tetapi belum tercapai. Luaran tambahan yang dijanjikan adalah jurnal internasional, sampai saat ini status masih under reviewed di jurnal biodiversitas.

E**. PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUPT). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas.

Penelitian ini tidak memiliki Mitra kerjasama.

F. **KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN**: Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Kendala yang dihadapi selama melakukan penelitian ini adalah, terhambatnya proses pembelian bahan karena pengaruh dari PSBB selama pandemi Covid, sehingga pelaksanaan penelitian sedikit terlambat dalam pengerjaannya. Selain itu, beberapa jurnal terlambat penerbitannya bahkan ada yang tidak menerima artikel sehinga kami kesulitan dalam mempublikasi artikel tepat waktu.

G**. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA:** Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Rencana tahapan selanjutnya adalah mengukur virulensi bakteri resisten karbapenem pada hewan uji seperti ulat lilin (*Galleria mellonella*). Tingkat virulensi untuk mengetahui seberapa patogen bakteri tersebut di dalam tubuh inang. Kami juga berencana untuk mensimulasi treatmen kombinasi antibiotik karbapenem dengan antibiotik lain. Dimulai dengan pendekatan in vitro menggunakan uji sinergisme, kemudian kombinasi antibiotik yang memiliki keampuhan tinggi secara in vitro, dilanjutkan dengan uji in vivo di hewan uji *Galleria mellonella*. Apabila hasilnya adalah bakteri tersebut memiliki virulensi yang tinggi di hewan uji coba, maka langkah selanjutnya adalah membuat primer multiplex untuk deteksi faktor virulensi yang menyebabkan keganasan bakteri tersebut pada inang. Multiplex primer tersebut diharapkan dapat diaplikasikan di rumah sakit untuk mengkorelasikannya dengan keganasan bakteri tersebut terhadap tingkat keparahan penyakit pada pasien di rumah sakit.

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant Acinetobacter infections. Chonnam Med J. 2014;50:37–44.
2. Marchesi JR, T. Sato AJ, Weightman TA, Martin JC, Fry *et al.* 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environ Microbiol.*, 64: 795-799.
3. Spellberg, B., & Rex, J. H. (2013). The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov, 12*(12), 963. doi:10.1038/nrd3957-c1
4. Piperaki, E. T., Tzouvelekis, L. S., Miriagou, V., & Daikos, G. L. (2019). Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: in pursuit of an effective
5. Viehman, J. A., Nguyen, M. H., & Doi, Y. (2014). Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii infections. *Drugs, 74*(12), 1315-1333. doi:10.1007/s40265-014-0267-8