



Karakterisasi Molekular Fragmen Gen *mexB* Isolat *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten

Molecular Characterization of mexB Gene Fragment from Multiresistant Pseudomonas aeruginosa Isolates

Fatmawaty Badaruddin¹, Imam Supardi², Usman Chatib Warsa³, Debbie Soefie Retnoningrum⁴

¹Department of Pharmacology, Hasanuddin University, School of Medicine, Makassar

²Post Graduate Center Padjadjaran University, Bandung

³University of Indonesia, Jakarta

⁴Biotechnology KPP-ITB, Bandung

KEYWORDS antibiotic resistant; efflux pump; sensitivity test; substrate recognition site

ABSTRACT Antibiotics have been widely used in the treatment of infectious diseases. However, their effectiveness has been questioned due to the tendency of some bacterial resistance to antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* among others has been known to be resistant to several antibiotics due to its MexAB-OprM efflux pump. Perhaps, the nucleotide sequence of its *mexB* gene fragment has changed followed by changes in amino acid sequence leading to alteration of the substrate recognition site. This alteration causes disability of antibiotics to recognize it and they are pumped out from the bacterial cell causing decrease in its inhibition concentration. An observational study was performed using four *P. aeruginosa* isolates (A,B,C and D) taken from four laboratories in Bandung, and the sensitivity test for several antibiotics (tetracyclin, ampicyllin, amoxycillin-clavulanat, kanamycin, ciprofloxazin, trimetoprim-sulphametoxazol, chloramphenicol dan eritromycin), was performed using Kirby-Bauer method. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) for 4 isolates were 20.57-39.07 mg/ml for erythromycin, 29.35-48.57 mg/ml for kanamycin, 30.35-68.75 mg/ml for tetracyclin, 45.57-97.50 mg/ml for ampicyllin, 23.69-97.50 mg/ml for chloramphenicol, 25.82-59.56 mg/ml for amoxycillin-clavulanat, 21.88-79.00 mg/ml for trimetoprim sulphametoxazol, and 20.58-56.97 mg/ml for ciprofloxazin. The increasing of MIC to each antibiotic was shown for 4 isolates of *P. aeruginosa* multiresistant to several antibiotics being studied. PCR technique was used to detect *mexB* gene fragment assumed as the substrate recognition site. The percentage of homology between the nucleotide sequence of *mexB* multiresistant *P. aeruginosa* and *mexB* *P. aeruginosa* producing siderophore pioverdin (Acc. No. L11616, NCBI) showed 96%, 100%, 97%, and 96% homology for *P. aeruginosa* A,B,C and D respectively. Employing DNASTAR program, fragment variant of *mexB* gene of 4 multiresistant isolates A, B, C and D was detected. This variation lead to amino acid substitution of Gly-417→Ser, Glu-417→Gln, Thr-424→Pro, Tyr-328→Phe, Asp-328→His for *P. aeruginosa* A,B,C and D respectively, along with the change of their secondary structure, that changed the functional protein of MexB.

Antibiotik telah digunakan secara luas untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri selama lebih dari 40 tahun. Obat anti infeksi tersebut secara drastis telah berhasil menurunkan morbiditas dan mortalitas berbagai penyakit infeksi, sehingga penggunaannya akhir-akhir ini meningkat. Walaupun secara umum penggunaan antibiotik telah berhasil mengobati berbagai penyakit infeksi, tetapi mengakibatkan timbulnya bakteri yang resisten terhadap antibiotik, menyebabkan efektivitas penggunaannya menurun. Hasil survei menunjukkan bahwa kira-kira 30% penderita yang dirawat

di rumah sakit memperoleh satu atau lebih terapi antibiotik, dan berbagai penyakit infeksi fatal telah berhasil diobati (Sande, 2000). Sejalan dengan itu antibiotik menjadi obat yang paling sering disalahgunakan (*misuse*) atau digunakan secara tidak rasional, sehingga meningkatkan risiko efek samping obat, resistensi dan biaya (Sastramiharja dkk., 1986).

Correspondence:

Dr. Fatmawaty Badaruddin, Department of Farmacology, Hasanuddin University School of Medicine, Makassar, Jalan Perintis Kemerdekaan, Makassar.

Bakteri negatif Gram umumnya lebih resisten terhadap sebagian besar antibiotik dan kemoterapeutik daripada bakteri positif Gram. Suatu survei melaporkan bahwa aktivitas antibiotik yang berasal dari alam berkurang lebih dari 50% terhadap *E. coli* (bakteri negatif Gram), namun masih aktif pada bakteri positif Gram (Nikaido, 1998).

Infeksi *P. aeruginosa* yang tergolong negatif Gram, umumnya terjadi pada orang dengan ketahanan tubuh yang menurun. Bakteri tersebut merupakan penyebab Infeksi Nosokomial terbesar kedua pada golongan bakteri negatif Gram setelah *E. coli*, menurut data dari *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS, 1999) (Carmeli dkk., 1999; Speciale dkk., 2000; Alonso dkk., 1999). Selain itu, antibiotik pada umumnya tidak efektif lagi terhadap *P. aeruginosa*, kecuali beberapa antibiotik seperti amikasin, gentamisin, karbenisilin dan tikarsilin (Nikaido, 2001; Barriere, 1995).

Resistensi terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh akumulasi antibiotik yang menurun di dalam sel. Penurunan akumulasi disebabkan oleh beberapa hal, antara lain, (1) penurunan permeabilitas sel terhadap antibiotik (Nakajima dkk., 2000; Li dkk., 2000; Masuda dkk., 1999), (2) peningkatan proses pengeluaran (*efflux*) antibiotik dari dalam sel (Morshed dkk., 1995; Levy, 1992), (3) dihasilkannya enzim β -laktamase serta (4) terjadinya perubahan target antibiotik (Morshed dkk., 1995; Levy, 1992; Gotoh, 2001). Permeabilitas sel yang menurun mengakibatkan antibiotik tidak dapat masuk ke dalam sel atau jumlah antibiotik yang masuk ke dalam sel berkurang. Sebagai contoh, resistensi terhadap senyawa β -laktam yang disebabkan oleh mutasi pada gen *OmpC* atau *OmpF* mengakibatkan penurunan jumlah atau tidak diproduksinya porin (saluran membran luar). Resistensi terhadap tetrasiklin disebabkan oleh mutasi pada gen *TetB*. Kedua hal ini mengakibatkan konsentrasi inhibisi dalam sel tidak pernah tercapai (Nguyen dan Gutmann, 1994; Paulsen dkk., 1996; Persing dkk., 1993).

Semua kehidupan organisme telah terpapar oleh komponen berbahaya melalui evolusi yang panjang dari kehidupan. Organisme akan membuat alat di dalam sel sehingga menyebabkan antibiotik dikeluarkan dari dalam sel. Sama seperti organisme hidup lainnya, mulai dari bakteri sampai manusia, dilengkapi dengan pompa efluks. Ketika bakteri mendapat antibiotik, mereka menggunakan taktik ini untuk melawan antibiotik dan mengembangkan resistensi. Pompa efluks pada bakteri negatif Gram sangat kompleks, pompa mengeluarkan multi-

antibiotik yang dikode oleh gen-gen pada kromosom dan dapat diekspresi melalui mutasi atau induksi (Russell dan Chopra, 1990).

Pada umumnya sistem efluks berhubungan dengan resistensi bakteri terhadap senyawa berstruktur mirip. Eksporter tetrasiklin (pompa yang mengeluarkan tetrasiklin) *TetB* pada *E. coli* hanya memompakan tetrasiklin dan senyawa serupa ke luar sel. Walaupun demikian, juga telah ditemukan bahwa sistem efluks yang memompakan berbagai senyawa yang tidak mirip keluar dari sel, dan dikenal sebagai pompa efluks multiantibiotik (Nakae, 1997). Sistem efluks multiantibiotik ini sangat merugikan karena sel yang mempunyai sistem ini menunjukkan penurunan sensitivitas terhadap berbagai antibiotik. *P. aeruginosa* ditemukan multi-resisten terhadap golongan kuinolon, β -laktam, karbapenem dan aminoglikosida yang diisolasi dari saluran pernapasan pada 80 pasien dari daerah Timur laut Jerman (Panzig dkk., 1999; Masuda dkk., 2000).

Tiga tipe pompa multiantibiotik telah diketahui. Pompa *tipe pertama* merupakan anggota fasilitator utama (*Major Facilitator* = MF) dengan transporter yang terdiri dari 12-14 heliks transmembran dan menggunakan kekuatan pergerakan proton sebagai sumber energi. Contoh tipe pertama ini adalah Bmr (*Bacillus multidrug resistance*), terdiri dari golongan NorA (norfloksasin) dan golongan QacA (senyawa amonium kuarternar) memompakan zat warna kation, fluorokuinolon dan disinfektan amonium kuarternar keluar dari sel secara terus menerus. *Tipe kedua* adalah Smr (*Staphylococcus multidrug resistance*) dengan transporter yang terdiri dari 4 heliks transmembran, dan memompa disinfektan amonium kuarternar dan zat warna keluar dari sel. *Tipe ketiga* famili divisi Nodulasi Resistensi (RND), terdiri dari sistem efluks multiantibiotik AcrAB, MexAB-OprM dan MtrCDE (Nikaido, 1998).

Menurut Paulsen dkk. (1996) mutasi pada operon *mexAB-OprM* *P. aeruginosa* menyebabkan mikroorganisme ini lebih sensitif terhadap tetrasiklin, kloramfenikol, golongan kuinolon, senyawa β -laktam, benzil penisilin, serta menyebabkan peningkatan akumulasi seluler beberapa antibiotik tersebut. Produksi berlebihan gen *mexA-mexB-OprM* ini mengakibatkan penurunan akumulasi tetrasiklin dan kloramfenikol. Penelitian Masuda dkk. (1993) memperlihatkan suatu *P. aeruginosa multiresisten* yang digambarkan mempunyai sistem efluks yang terdiri dari komponen *mexC-mexD-OprJ*. Bila ekspresi

operon ini berlebihan, maka sistem ini mempunyai substrat spesifik yang sama dengan *mexAB-OprM*. Penelitian lain dari Paulsen dkk.,1996 menemukan bahwa produksi berlebihan *mexC-mexD-OprJ* menyebabkan penurunan akumulasi terhadap golongan kuinolon, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Menurut Levy (1992) dan Poole (2002), kejadian mutasi pada gen tersebut disebabkan oleh induksi gen-gen pada kromosom akibat pemaparan antibiotik dari alam dan lingkungan klinik (George, 1996; Rubinstein, 1999).

Aktivator menstimulasi transkripsi gen menggunakan enzim RNA poli-merase, sedangkan represor bekerja berlawanan terhadap aktivator melalui pencegahan transkripsi. Sampai saat ini ada tiga gen represor telah diidentifikasi pada pompa efluks, yaitu gen represor *nalB (mexR)* untuk *mexAB-OprM* (Rubinstein, 1999; Poole dan Srikumar, 2001), gen represor *nfxB* untuk *mexC-mexD-OprJ*, (Poole dkk., 1996; Pechere dkk., 1998) dan gen represor *nfxC* untuk *mexE-mexF-oprN* (Saito dkk., 2001).

Penelitian oleh Zhao dkk.,1998 memperlihatkan bahwa gen *OprM* dapat diekspresi dan berfungsi pada efluks antibiotik yang tidak tergantung pada gen *mexA-mexB*. Burns dkk.,1996 mengidentifikasi *Burkholderia cepacia* yang resisten terhadap beberapa antibiotik yang disebabkan oleh pompa efluks antibiotik. Srikumar dkk.,1997 memperlihatkan 3 bagian pompa efluks yang diperlukan untuk mengeluarkan substrat antibiotik dan berfungsi sebagai pompa efluks multiantibiotik.

P. aeruginosa multiresisten diperlihatkan secara luas dengan ekspresi ber-lebihan 3 operon, suatu transporter membran berupa protein membran luar yang bekerja bersama-sama memompa bermacam-macam antibiotik, seperti β -laktam, golongan kuinolon, tetrasiklin, kloramfenikol, trimetoprim dan sulfametoksazol (Piddock, 1995; Ma dkk., 1994). Resistensi yang disebabkan oleh pompa efluks biasanya sinergi dengan gangguan permeabilitas membran luar sehingga mengeluarkan obat secara aktif (Hancock, 1998; Evans dan Poole, 1999). Pompa efluks aktif memainkan peran yang sangat penting pada mekanisme pertahanan seluler terhadap senyawa berbahaya yang terdapat pada banyak organisme hidup (Nguyen dkk., 1994; Russel dan Chopra, 1990).

Penelitian Guan dkk., 1999, memperlihatkan topologi membran MexB yang unik terdiri atas 12 segmen transmembran dan 2 segmen hidrofily yang besar (*loop*) terdiri dari 311 dan 314 residu asam amino. Segmen hidrofily pertama berlokasi antara

residu asam amino 29 sampai 338 (antara Transmembran, TMS 1 dan 2), dan segmen hidrofily kedua berlokasi antara residu asam amino 558 sampai 871 (antara TMS 7 dan 8) secara berturut-turut. Hal ini menunjukkan bahwa *loop* ini berinteraksi dengan subunit pompa lain, seperti protein MexB berasosiasi dengan MexA dan protein membran luar OprM. Deretan separuh ujung amino dan karboksi memperlihatkan homologi 30% dengan segmen transmembran 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 berimpit dengan segmen 7, 8, 9,10, 11 dan 12 secara berturut-turut. Hal ini memperlihatkan bahwa MexB merupakan hasil duplikasi. Analisis topografi membran MexB telah memverifikasi model ini. Menurut Poole dkk.,2001 dan Nikaido,1998, terjadinya bakteri multiresisten terhadap beberapa antibiotik dapat disebabkan oleh kombinasi beberapa gen resisten, setiap kode gen resisten hanya untuk setiap satu antibiotik saja.

Pada penelitian ini, diambil empat isolat *P. Aeruginosa multiresisten* resisten terhadap tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, siprofloksasin, ampisilin, amoksisilin-klavulanat, trimetoprim-sulfametoksazol, dan kanamisin. Suatu sifat unik pompa efluks *P. aeruginosa multiresisten* dapat diamati dengan menilai multiresisten dan mempelajari urutan nukleotida dan asam amino fragmen protein MexB pada *P. aeruginosa multiresisten* dibandingkan dengan urutan nukleotida dan urutan asam amino fragmen protein MexB *P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor pioverdin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung dan Laboratorium Bioteknologi Kelompok Penelitian dan Pengembangan (KPP), ITB.

Bahan penelitian isolat *P. aeruginosa* diperoleh dari Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Perjan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung, Laboratorium Klinik Prodia Bandung, Laboratorium Klinik Rumah Sakit Borromeus Bandung dan Laboratorium Mikrobiologi Biofarma Bandung.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu, 1) eksperimen laboratorium untuk uji kepekaan dan penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM), pada *P. aeruginosa* terhadap beberapa antibiotik (tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, fluorokuinolon, ampisilin, amoksisilin klavulanat, trimetoprim-sulfametoksazol, dan kana-

misin); 2) Observasi yang bersifat eksploratif yaitu uji diagnostik laboratorium untuk menentukan perubahan nukleotida fragmen gen *mexB* pada *P. aeruginosa*, kemudian perubahan nukleotida yang terjadi dideduksi menjadi asam amino sampai terlihat adanya perubahan asam amino.

Analisis data dilakukan dengan bantuan program komputer DNA Star untuk menentukan homologi urutan nukleotida dan urutan asam amino hasil deduksi ke empat fragmen gen *mexB multiresisten P. aeruginosa* isolat A, B, C dan D. Hasil analisis tersebut dibandingkan dengan data fragmen *mexB P. aeruginosa multiresisten* yang menghasilkan siderofor pioverdin diambil dari GenBank.

Metode analisis

1. Variasi urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A, B, C dan D *multiresisten*, dibandingkan dengan urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor pioverdin.
2. Perbedaan urutan asam amino fragmen protein MexB *P. aeruginosa* isolat A, B, C dan D *multiresisten*, dibandingkan dengan urutan asam amino fragmen protein MexB *P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor pioverdin.

HASIL

Isolat *P. aeruginosa multiresisten*

Sebanyak 36 isolat *P. aeruginosa multiresisten* dikumpulkan selama kurang lebih 10 bulan dari bulan Januari sampai dengan Oktober 1999. Dari ke 36 isolat *P. aeruginosa multiresisten* hanya empat isolat *P. aeruginosa multiresisten* terhadap tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, siprofloksasin, ampisilin, amoksisilin-klavulanat, trimetoprim sulfametoksazol dan kanamisin, yang digunakan dalam penelitian ini dan diambil dari empat laboratorium. Empat isolat *multiresisten P. aeruginosa* yang diteliti dianggap mewakili beberapa isolat dari setiap laboratotium.

Nilai KHM *P. aeruginosa* isolat A, B, C dan D adalah antara 20,57 - 39,07 µg/ml untuk eritromisin, antara 29,35 - 48,57 µg/ml untuk kanamisin, antara

30,35 - 68,75 µg/ml untuk tetrasiklin, antara 45,57 - 97,50 µg/ml untuk ampisilin, antara 23,69 - 97,50 µg/ml untuk kloramfenikol, antara 25,82 - 59,56 µg/ml untuk amoksisilin-klavulanat, antara 21,88 - 79,00 µg/ml untuk trimetoprim sulfametoksazol, dan antara 20,58 - 56,97 µg/ml untuk siprofloksasin.

Mao dkk. (2001) menyatakan bahwa KHM gentamisin, tetrasiklin, amikasin dan karbenisilin untuk *P. aeruginosa* ditemukan bervariasi antara 0,12 - 8,00 µg/ml, berbeda dengan penelitian Nikaido, 1998, KHM karbenisilin (golongan penisilin) untuk *P. aeruginosa* meningkat sampai 2000 kali lebih tinggi dari pada galur fenotipe normal (sensitif multi-antibiotik). KHM dari penisilin, sefalosporin dan kuinolon meningkat bila terjadi hipereksresi pompa MexA-MexB-OprM.

Berdasarkan hasil penentuan KHM yang meningkat pada penelitian ini, disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai KHM untuk *P. aeruginosa* terhadap beberapa antibiotik, semakin kecil pola kepekaan *P. aeruginosa* terhadap beberapa antibiotik, sehingga mengakibatkan terjadinya *P. aeruginosa multiresisten*.

Hasil amplifikasi fragmen Gen *mexB P. aeruginosa Multiresisten* berukuran 585 pb

Dengan menggunakan pasangan primer yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang mengenali posisi nukleotida 1014 - 1674 gen *mexB* yang diperoleh dari GenBank, diperoleh hasil amplifikasi masing-masing ke empat fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C, dan D *multiresisten* berukuran sekitar 585 pasangan basa (pb).

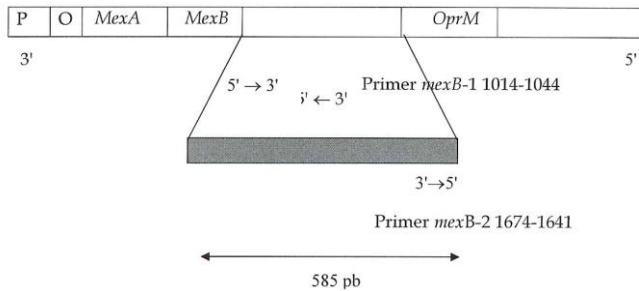
Hasil perancangan primer

Sepasang primer untuk mengamplifikasi fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten* yang telah dirancang pada penelitian sebelumnya (Poole dkk., 1993), disebut sebagai *mexB-1* untuk *sense* terdiri dari 30 nukleotida, dan *mexB-2* untuk *antisense* terdiri dari 33 nukleotida, urutan nukleotida sepasang primer ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan Nukleotida Primer *mexB-1* dan *mexB-2*

No	Nama Primer	Urutan nukleotida
1.	<i>MexB-1 (sense)</i> 1014-1044	5' GGATCCCCGCAGGGCATGAAGGTGTGGT CTAC 3'
2.	<i>MexB-2(antisense)</i> 1674-1641	5' AAGCTTCAGTCGGGGAGGAACGCGGTGG GAATG 3'

Berdasarkan hasil perancangan ini maka primer *mexB*-1 dan *mexB*-2 disintesis di *Pacific Oligos, resource Science Management, Southern Cross University, Lismore, NSW 2480 Australia*.



Gambar 1 Posisi Primer *mexB*-1 dan *mexB*-2 terhadap Fragmen *mexB*. *P. aeruginosa multiresisten*

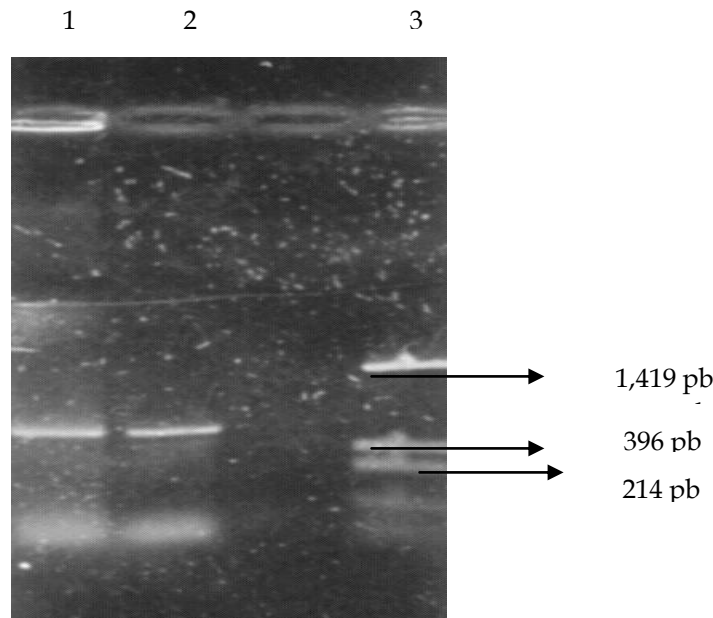
Pada Gambar 1 ditunjukkan posisi urutan nukleotida yang dipilih untuk primer *mexB*-1 menempel pada posisi basa ke 1014 sampai basa ke 1044 dari *start codon*. Urutan primer *mexB*-2 adalah

ada posisi basa ke 1674 sampai basa ke 1641 juga dari *start codon*.

Produk PCR Fragmen Gen *mexB* *P. aeruginosa multiresisten* berukuran 585 pb

Hasil amplifikasi ke empat fragmen gen *mexB* *P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten* mempunyai ukuran 585 pb (diperoleh dari hasil perhitungan grafik regresi linier jarak migrasi terhadap logaritma bobot molekul), setelah dibandingkan dengan DNA marker pUC₁₉ yang telah dipotong dengan enzim *Hinfl* (Gambar 2).

Hasil analisis elektrogram ke empat fragmen gen *mexB* *P.aeruginosa* A, B, C dn D *multiresisten* berukuran 585 pb, menunjukkan bahwa ukuran tersebut tidak sesuai dengan ukuran fragmen gen *mexB* *P. aeruginosa* pada GenBank yang berukuran 634 pb menurut Nikaido (1998). Ukuran nukleotida yang dibatasi oleh sepasang primer sewaktu dilakukan PCR, mengenali gen *mexB* posisi 1044 - 1674, yang hanya berukuran 585 pb.



Gambar 2 : Elektrogram Produk PCR Fragmen Gen *mexB* *P. aeruginosa multiresisten* pada Gel Agarosa 1%.

Keterangan : Lajur 1 dan 2: Produk PCR Fragmen Gen *mexB* *P.aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten*. Lajur 3 : DNA Marker.

Hasil analisis sekuensing langsung fragmen Gen *mexB* *P. aeruginosa* Isolat A, B, C dan D *multiresisten* berukuran 585 pb

Pembacaan urutan nukleotida hasil sekuensing langsung fragmen gen *mexB* *P. aeruginosa*

A, B, C, dan D *multiresisten*, dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer yang mengenali urutan nukleotida fragmen *mexB* *P. aeruginosa multiresisten*.

Untuk mengetahui apakah terdapat variasi nukleotida dan urutan asam amino isolat klinik

fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten*, maka dilakukan analisis homologi antara urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C, dan D *multiresisten* dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang menghasilkan siderofor pioverdin, menggunakan program komputer *DNA Star*.

Hasil analisis urutan nukleotida fragmen Gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C, dan D *multiresisten*.

Untuk mengetahui apakah terdapat variasi urutan nukleotida fragmen nukleotida *mexB P. aeruginosa multiresisten*, maka dilakukan analisis homologi antara urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa multiresisten*, dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang menghasilkan siderofor pioverdin, menggunakan program komputer *DNA Star*.

Persentase homologi susunan nukleotida antara isolat fragmen gen *mexB P. Aeruginosa* A, B, C, dan D *multiresisten* dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang menghasilkan siderofor pioverdin (L11616, NCBI) untuk fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A *multiresisten* adalah 96%, untuk fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat B *multiresisten* adalah 100%, untuk fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat C *multiresisten* adalah 97%, untuk fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat D *multiresisten* adalah 96%. Hasil penelitian memperlihatkan homologi yang tinggi antara fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A, B, C dan D *multiresisten*, dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor pioverdin.

Perubahan nukleotida pada fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A *multiresisten* adalah pada kodon CTG-417→CTA, kodon TCT-429→TTT, kodon GCT-511→GGT, kodon CTG-715→CCG. Pada fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat B *multiresisten*, terjadi perubahan kodon CGA-304→CAA (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi Glutamin), kodon AGC-306→AAC (terjadi perubahan asam amino Serin menjadi Asparagin), kodon CCT-415→CAT, kodon TGC-317→TAC, kodon GCT-438→GTT, kodon GCT-511→GTT. Pada fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat C *multiresisten*, terjadi perubahan kodon CAC-40→CCC (terjadi perubahan asam amino Prolin menjadi asam Aspartat), kodon GCA-246→ACT, kodon CAT-247→ACT, kodon ATG-314→ACT, kodon ATG-314→AAG, kodon TGT-330→TCT, kodon TGT-330→TTT, GCT-379→CTT, GCT-379→GGT, TGC-417→TAC, GCT-511→GGT. Pada fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat D *multiresisten*, terjadi perubahan

kodon TAC-35→TTC, CGA-38→CCA (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi Prolin), kodon CAC-40→CCC (terjadi perubahan asam amino Histidin menjadi prolin), kodon CGA-304→CCA (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi Prolin), kodon CAC-325→AAG (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi lisin), kodon CGC-378→CCG (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi Prolin), kodon GCT-379→AAA, kodon CGC-391→CCC (terjadi perubahan asam amino Arginin menjadi Prolin), kodon CAT-469→CGT, kodon CAT-475→CGT, kodon TGT-480→TAT, kodon TCG-504→TGG, kodon GCT-511→GGT, kodon TCT-531→TTT, kodon ATC-713→ACC, kodon CTG-715→CCG.

Dari hasil homologi ini ditemukan adanya polimorfisma. Perubahan nukleotida pada fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten*, menyebabkan terjadinya perubahan asam amino, tanpa disertai terjadinya perubahan sifat struktur kimia. Perubahan ini dapat dilihat pada Tabel 2 sampai 6. Terjadinya perbedaan nukleotida menyebabkan antibiotik tidak dikenali dan dikeluarkan dari dalam sel bakteri. Sesuai dengan penelitian Poole dkk. (1993) yang memperlihatkan bahwa operon *mexAB-OprM P. aeruginosa* selain mensekresi siderofor pioverdin juga beberapa gennya mengeluarkan beberapa antibiotik, sehingga menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. Hasil penelitian ini memperlihatkan terjadinya ekspresi sistem efluks multiantibiotik *mexAB-OprM*. Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya mutasi pada gen regulator *mexR* (Zarifi dkk. 1999). Berbeda dengan ekspresi sistem efluks *MexCD-OprJ*, bila gen regulator *nfxB* termutasi menyebabkan *P. aeruginosa* resisten terhadap fluorokuinolon, 4 generasi cephem (*celpirome* dan *cefzozopran*), tetapi tidak terhadap β -laktam, termasuk golongan *cephem* (*ceftazidime* dan *cefoperazone*) (Murata dkk., 2000). Menurut Evans dan Poole (1999), ekspresi gen efluks diperkirakan sebagai suatu fungsi pertumbuhan pada suatu variasi strain. Menurut Murata dkk. (2000), *MexB* dan *MexD* adalah komponen primer dari sistem efluks yang bertanggung jawab untuk menyeleksi substrat.

Analisis hasil deduksi urutan nukleotida fragmen Gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten*

Untuk mengetahui apakah terdapat variasi urutan asam amino fragmen *MexB P. aeruginosa multiresisten*, dilakukan analisis homologi antara urutan asam amino fragmen protein *MexB P. aeruginosa multiresisten*, dengan fragmen protein

MexB *P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor piov-
erdin, menggunakan program komputer DNA Star.

Berdasarkan hasil penelitian secara kuan-
titatif ditunjukkan bahwa ter-dapat perubahan asam
amino Glu -92→ Gln (perubahan asam Glutamat
menjadi Glutamin pada posisi 92), perubahan asam
amino Gly -99→ Ser (perubahan Glisin menjadi Serin
pada posisi 99), pada fragmen protein MexB *P.*
aeruginosa isolat A *multiresisten*, perubahan asam
amino Glu -92→ Gln (perubahan asam Glutamat
menjadi Glutamin pada posisi 92) pada fragmen
protein MexB *P. aeruginosa* isolat B *multiresisten*,
perubahan asam amino Thr -4→ Pro (perubahan
Threonin menjadi Prolin pada posisi 4), pada
fragmen protein MexB *P. aeruginosa* isolat C
multiresisten, perubahan asam amino Tyr -2→ Phe
(perubahan asam amino Tirosin menjadi Fenilalanin
pada posisi 2), perubahan asam amino Asp -3 → His

(perubahan asam Aspartat menjadi Histidin pada
posisi 3), dan perubahan asam amino Thr -4 → Pro
(perubahan Treonin menjadi Prolin pada posisi 4),
pada fragmen protein MexB *P. aeruginosa* isolat D
multiresisten.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa
beberapa asam amino tidak penting dalam sifat
resistensi di antaranya adalah Leusin, Isoleusin,
Metionin, Valin, Alanin dan Sistein, Arginin, Lisin
dan Triptopan. Menurut penelitian Poole dkk. (1993)
operon *mexA-mexB-OprM* yang mensekresi siderofor
pioverdin pada *P. aeruginosa* memperlihatkan bahwa
salah satu gen dari operon ini menyebabkan kejadian
efluks aktif beberapa antibiotik. Sementara itu
menurut penelitian Nikaido dkk. (1998), kejadian
multiresisten disebabkan oleh kombinasi beberapa
gen resistensi, setiap sandi resistensi hanya untuk
setiap satu obat saja.

Tabel 2. Sifat Fisikokimia Glisin (Gly) dan Serin (Ser)

No.	Struktur kimia	Gly	Ser
1.	Bobot molekul *)	75	105
2.	Polaritas*)	Non polar	Polar
3.	Pembentukan heliks α *)	Stabil	Stabil
4.	Gugus fungsi *)	R=hidroksil	R=hidroksil
5.	Gugus metil pKa-COOH*)	2,34	2,21
6.	Gugus karboksi pKa-NH ₃ *)	9,6	9,15
7.	Hidrofilisitas**)	-0,11	0,18
8.	Indeks antigenik**)	-0,6	-0,40
9.	Surface Probability Plot**)	0,31	0,19

Keterangan : *) Sumber Lehninger (1982) dan **) Program Protean DNA Star

Tabel 3. Sifat Fisikokimia Asam Glutamat (Glu) dan Glutamin (Gln)

No.	Struktur kimia	Glu	Gln
1.	Bobot molekul *)	147	45
2.	Polaritas*)	Negatif	polar
3.	Pembentukan heliks α *)	Tidak stabil	stabil
4.	Gugus fungsi *)	R=karboksil	R=amida
5.	Gugus metil pK _α -COOH*)	2,19	2,17
6.	Gugus karboksi pK _α -NH ₃ *)	9,67	9,13
7.	Hidrofilisitas**)	-0,13	-0,15
8.	Indeks Antigenik**)	-0,8	-0,39
9.	Surface Probability Plot**)	0,41	0,20

Keterangan : *) Sumber Lehninger (1982) dan **) Program Protean DNA Star

Tabel 4. Sifat fisikokimia Treonin (Thr) dan Prolin (Pro)

No.	Struktur kimia	Thr	Pro
1.	Bobot molekul ^{*)}	119	115
2.	Polaritas ^{*)}	Polar	Non polar
3.	Pembentukan heliks α ^{*)}	Tidak stabil	Tidak stabil
4.	Gugus fungsi ^{*)}	R=hidroksi	R=hidrokarbon
5.	Gugus metil pK α -COOH ^{*)}	63	1,99
6.	Gugus karboksi pK α -NH ₃ ^{*)}	10,43	10,60
7.	Hidrofilisitas ^{**)}	-0,12	-0,20
8.	Indeks Antigenik ^{**)}	-0,9	-0,49
9.	<i>Surface Probability Plot</i> ^{**)}	0,35	0,23

Keterangan : ^{*)} Sumber Lehninger (1982) dan ^{**)} Program Protean DNA Star.

Tabel 5. Sifat Fisikokimia Tirosin (Tyr) dan Fenilalanin (Phe)

No.	Struktur kimia	Tyr	Phe
1.	Bobot molekul ^{*)}	133	155
2.	Polaritas ^{*)}	Negatif	Positif
3.	Pembentukan heliks α ^{*)}	Tidak stabil	Stabil
4.	Gugus fungsi ^{*)}	R=karboksi	R=amina
5.	Gugus metil pKa-COOH ^{*)}	2,20	1,83
6.	Gugus karboksil pKa-NH ₃ ^{*)}	9,11	9,13
7.	Hidrofilisitas ^{**)}	-0,14	-0,23
8.	Indeks Antigenik ^{**)}	-0,86	-0,34
9.	<i>Surface Probability Plot</i> ^{**)}	0,35	0,23

Keterangan : ^{*)} Sumber Lehninger (1982) dan ^{**)} Program Protean DNA Star

Tabel 6. Sifat Fisikokimia Asam Aspartat (Asp) dan Histidin (His)

No.	Struktur kimia	Asp	His
1.	Bobot molekul ^{*)}	181	165
2.	Polaritas ^{*)}	Polar	Non polar
3.	Pembentukan heliks α ^{*)}	Stabil	Stabil
4.	Gugus fungsi ^{*)}	R=hidroksil	R=hidrokarbon
5.	Gugus metil pK α -COOH ^{*)}	2,09	21,82
6.	Gugus karboksil pK α -NH ₃ ^{*)}	9,82	9,17
7.	Hidrofilisitas ^{**)}	-0,16	-0,20
8.	Indeks Antigenik ^{**)}	-0,6	-0,35
9.	<i>Surface Probability Plot</i> ^{**)}	0,45	0,23

Keterangan : ^{*)} Sumber Lehninger (1982) dan ^{**)} Program Protean DNA Star

PEMBAHASAN

Telah terjadi perbedaan asam amino Glu-417→Ser fragmen protein MexB *P. aeruginosa* A multiresisten, asam amino Glu-417→Gln fragmen protein MexB *n P. aeruginosa* B multiresiste, asam amino Tre-424→Pro fragmen protein MexB *P.*

aeruginosa C multiresisten, asam amino Tir-328→Phe fragmen protein MexB *P. aeruginosa* multiresisten dan asam amino Asp-328→His fragmen protein MexB *P. aeruginosa* D multiresisten. Urutan asam amino dari hasil deduksi urutan nukleotida gen fragmen gen *mexB n P. aeruginosa* A, B, C dan D multiresisten tidak identik dengan urutan asam amino fragmen protein

MexB *P. aeruginosa* yang menghasilkan siderofor pioverdin (L11616, NCBI) galur K 437.

Pada penelitian ini daerah fragmen protein MexB *P. aeruginosa multiresisten* yang diduga sebagai tempat pengenalan substrat menurut Guan dkk. (1999), adalah antara dua segmen hidrofil yang besar (loop), terdiri dari 311 dan 314 residu asam amino. Segmen hidrofil pertama berlokasi antara residu asam amino 29 sampai 338 (antara TMS 1 dan 2), dan segmen hidrofil kedua berlokasi antara residu asam amino 558 sampai 871 (antara TMS 7 dan 8), secara berturut-turut. Penelitian Eda dkk. (2003), dan Nakajima dkk., 2000 menemukan deretan separuh ujung amino dan karboksi memperlihatkan homologi 30%, dan daerah fragmen gen *mexB P. aeruginosa multiresisten*, ini merupakan suatu kompleks yang diperlukan untuk aktivitas transport substrat.

Elena dkk. (2002), mengatakan bahwa struktur dari transporter tipe RND bertanggung jawab terhadap pengenalan substrat multiantibiotik. Menurut Eda dkk. (2003), loop periplasmik yang besar dari tipe transporter ini termasuk sebagai tempat pengenalan substrat multiantibiotik dan sebagai pompa efluks. Diperlihatkan bahwa struktur protein yang berubah tersebut sensitif terhadap β -laktam, tetapi tidak mengenali aminoglikosida. Demikian pula pada segmen trans-membran, semua protein baru, memperlihatkan sifat selektif terhadap antibiotik. Penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri negatif Gram menyeleksi dan mengeluarkan substrat dari ruang periplasma sebelum bahan berbahaya berpenetrasi ke dalam membran sitoplasma.

Analisis menggunakan program DNA *Star*, menunjukkan bahwa pada keempat isolat terjadi perubahan struktur sekunder berupa adanya perubahan muatan rata-rata, muatan negatif, *surface probability* dan antigenisitas. Urutan asam amino dari hasil deduksi urutan nukleotida fragmen gen *mexB P. aeruginosa* A, B, C dan D *multiresisten* tidak identik dengan urutan asam amino fragmen protein MexB *P. aeruginosa* yang menghasilkan siderofor pioverdin (L11616, NCBI) galur K 437. Hal ini menunjukkan terjadi perubahan struktur, sehingga fungsi MexB sebagai tempat pengenalan substrat juga berubah.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan adanya variasi (polimorfisme) nukleotida pada daerah penyandi fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A, B, C, dan D *multiresisten* dibandingkan dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor

pioverdin. Terdapat perbedaan asam amino fragmen gen *mexB P. aeruginosa* isolat A, B, C, dan D *multiresisten*, dibandingkan dengan fragmen gen *mexB P. aeruginosa* yang mensekresi siderofor pioverdin.

Terkait dengan hasil penelitian ini, beberapa penelitian dapat disarankan antara lain :

1. Pemeriksaan sensitivitas terhadap beberapa antibiotik sebelum pemberian antibiotik untuk pengobatan infeksi oleh *P. aeruginosa*.
2. Mekanisme fragmen gen *mexB* pada bakteri *P. aeruginosa multiresisten* sebagai tempat pengikat substrat.
3. Pencarian inhibitor fragmen gen *mexB multiresisten P. aeruginosa* sebagai senyawa baru dalam mengatasi resistensi multi-antibiotik.
4. Sistem efluks MexAB-OprM sebagai penyebab *P. aeruginosa* menjadi lebih virulen.

Disamping itu perlu dipertimbangkan penggunaan dua macam antibiotik pada pengobatan infeksi *P. aeruginosa*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Mendikbud, Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung, KPP-Bioteknologi ITB, dan Ucapan terima kasih khususnya kami sampaikan kepada Bapak Prof. Dr. dr. Imam Supardi, Sp.MK.

KEPUSTAKAAN

- Alonso A, Campanario E, Martines JL 1999. Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*; 145(Pt 10):2857-62.
- Barriere SL, Jacobs RA 1995. Clinical use of antimicrobial Ir; Basic and Clinical Pharmacology. 6 th. A Lange Medical Book, 1995; 752-768.
- Burns JL, Wadsworth CD, Barry JJ and Goodall CP. Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 307-313.
- Carmeli Y, Nicolas T, George ME, and Mathew HS 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* comparison of risk associated with different antipseudomonas agents. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:1379-82.
- Evans K and Poole K 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux System *Pseudomonas aeruginosa* is growth phase regulated. *FEMS microbiol Lett.* 173 : 35-39.
- Eda S, Yoncyama H, Nakae T 2003. Function of the MexB Efflux-Transporter Divided into Two Halves. *Biochemistry*; 42(23):7238-44.
- Elena B, Tikhonova, Qutju W and Helen I 2002. Chimeric Analysis of the Multicomponent Multidrug Efflux Transporter from Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*; 184(23)6499-507.

- Gotoh N 2001. Antibiotic resistance caused by membrane impermeability and multidrug efflux systems. *Nippon Rinsho*; 59(4):712-18.
- George AM 1996. Multidrug Resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*; 139(1):1-10.
- Guan L, Michael E, Hiroshi Y and Taiji N 1999. Membran topology of the xenobiotic-exporting subunit MexB of the MexA,B-OprM. Extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*; 274: 110517-22.
- Hancock RE 1998. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*. 5(1):37-42.
- Li XZ, Zhang L, Poole K 2000. Interplay between the MexAB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother*.45; 433-436.
- Levy SB 1992. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. Departemen of Mol. Biol. Microbiology and Medicine. Tufts school of Medicine, New England Medical Center Boston, 36: 695-703.
- Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T 1999. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 43 (2):400-2.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44(12):3322-7.
- Morshed SR, Lei Y, Yoncyama H, Nakae T 1995. Ekspresion of genes yang associated with antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*; 210(2): 356-62.
- Ma D, Cook DN, Hearst JE and Nikaido H 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*; 2(12):489-93.
- Mao W, Warren MS, Lee A, Mistry A, Lomovskaya O 2001. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45(7):2001-7.
- Murata T, Kuwakaki M, Shin T, Gotoh N, Nishino T 2000. The substrate specificity of tripartite efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* is determined by the RND components. *Antimicrob. Biochem Biophys Res Commun*. 299(2);2 74-51.
- Nikaido H 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr opin Microbiol*. Okt,1(5): 516-23
- Nikaido H 2001. Preventing drug acces to target : cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*; 12(3): 215-23.
- Nakajima A, Sugimoto Y, Yoncyama H and Nakae T 2000. Lokalisasi of the outer Membrane subunit OprM of resistance-nodulation- cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*; 275(29):1-11
- Nguyen VJC, Gutmann L 1994. Resistance to antibiotics caused by decrease of the permeability in Gram-negative bacteria. *Presse Med.*; 23(11):522-31.
- Nakae T 1997. Antibiotic extrusion and multidrug resistance. *Nippon Rinsho*; 55(5):1173-8.
- Panzig B, Schroder G, Pitten FA, Grundling M 1999. A large outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in north-eastern Germany. *J Antimicrob Chemother*; 43:445-18.
- Paulsen IT, Brown MH and Skurrey RA 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems, *Microbiological Reviews*; 60(4):575-608.
- Persing DH, Smith TE, Tenover FC, and White TJ 1993. In vitro nuc-leic acid amplification techniques, diagnostic molecular microbiology: Mayo Foundation Rochester 1993; 51- 87.
- Poole K, Krebs K, Nelly MC and Neshad 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : evidence for involvement of an efflux operon . *J Bacteriol*. 175(22). 7363-73.
- Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao QX, Wada, A Yamasuki T, Neshat S, Yamagishi JL, Li XZ, and Nishino T 1996. Overexpression of the mjxC-mexD-OprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol*. 21(4) : 713-724.
- Poole K, Srikumar R 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa* componenets, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 1(1):59-71.
- Zhao Q, Zin-Zhi L, Ramakrishnan S and Keith P 1998. Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob. Agents Chemother*; 42:1682-88.
- Poole K 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*; 3(2):77-98.
- Pechere JC, Michea-Hamzhepour M, Kochler T 1998. Antibiotic efflux, a mechanism of multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull Acad Natl med*; 182(3):599-612.
- Piddock IJ 1995. Mekanisms of resistance to fluoroquinolone. *Drugs*. 49(Supp 2):29-35.
- Russell AD and Chopra I 1990. Understanding Antibacterial Action and Resistance. New York: Ellis Horwood.
- Rubinstein E 199. Antimicrobial resistance-Pharmacological solutions. *Infection*; 27 Suppl 2:S32-4.
- Sande MA, Kapusnik-Uner JE, Mandell GL 2000. Antimicrobial Agents : General Consideration. *In* : Goodman & Gilman, A. et al. eds. Pharmacological basis of Therapeutic, 9th ed. Mc Graw-Hill; 1018-46.
- Sastramihardja HS, Adinoto W, Sumadilaga RS, Widiaputri EA 1986. Tinjauan Farmakologi Antibiotika, Disinfektan dan Antiseptik. Naskah pada seminar dan lokakarya Penanggulangan Infeksi Nosokomial di RS Hasan Sadikin Bandung.
- Saito K, Eda S, Maseda H, Nakae T 2001. Molecular mechanism of MexR mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump _expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*; 195(1):23-8.
- Srikumar R, Li XZ, Poole K 1997. Inner membran efflux components are responsible for beta laktam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*; 179(24):7875-81.
- Speciale A, Musumeci R, Blandino G, Caccamo F, Siracusa V, Renis M 2000. Molecular mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents*; 4(2): 151-6.
- Lehninger AL 1982. Principles of biochemistry. USA: Worth Publishers; 107-131.
- Zarifi IZ, L Catherine, K Thilo, P Jean-Claude and P Patrick 1999. *In vivo* Emergence of Multidrug-Reistant Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* Overexpressing the active Efflux System MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. 43 : 287-91.