

SEKUENSING METAGENOMIK *ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES* (ARG) PADA SAMPEL LINGKUNGAN DI RUMAH POTONG UNGGAS MENGGUNAKAN MINION NANOPORE

Puji Rahayu¹ *, Diyan Cahyaningsari¹, Hanif Anisatun¹, Metrizar¹ Fuad Alfarizi¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi penulis: puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRAK

Metode sekuensing metagenomik terutama untuk keperluan diagnostik mikrobiologi selama ini terkendala dengan sulitnya proses sekuensing, biaya yang cukup besar dan lamanya waktu yang diperlukan. Penemuan baru MinION Nanopore diharapkan mampu memperkecil kendala tersebut diatas. Dengan kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba/*Antimicrobial Resistance Genes* (ARG), MinION diharapkan mampu mempercepat diagnosa dan penyajian profil resistensi. Menggunakan total DNA sampel air limbah pemotongan Rumah/Tempat Pemotongan Unggas (RPU/TPU) di Kota Bogor, diperoleh profil bakteri termasuk di dalamnya bakteri patogen dan juga profil resistensi pada masing-masing bakteri. MinION Nanopore mampu mengidentifikasi lebih dari 100 mikroorganisme tanpa melakukan isolasi, diantaranya ditemukan lebih dari 16 bakteri yang bersifat patogen. Selain itu MinION juga mampu mengidentifikasi 25 ARG dalam bakteri tersebut. Dengan menggunakan software bioinformatika EPI2ME ditemukan 7 target *Antimicrobial Resistance* (AMR) yaitu *Aminoglycoside Resistance*, *Beta Lactam Resistance*, *Lincosamide Resistance*, *Macrolide Resistance*, *Phenicol Resistance*, *Quinolone Resistance*, *Sulfonamide Resistance*. Sekuensing metagenomik dengan menggunakan MinION Nanopore mampu menghasilkan data secara komprehensif dan juga kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba (ARG) dalam jangka waktu yang tidak terlalu lama.

Kata kunci : Sekuensing Metagenomik, MinION Nanopore, *Antimicrobial Resistance* (AMR), *Antimicrobial Resistance Genes* (ARG)

PENDAHULUAN

Untuk mencegah dan mengendalikan risiko antimicrobial resistance (AMR) di sektor ternak dan kesehatan hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian menetapkan lima pendekatan strategis. Pendekatan tersebut adalah meningkatkan kesadaran dan pemahaman tentang AMR, memperkuat pengawasan dan penelitian, meningkatkan pengendalian infeksi, mengoptimalkan penggunaan antimikroba yang bijaksana dan bertanggung jawab, serta memperluas ketersediaan sumber daya berkelanjutan untuk pengobatan.

Analisis AMR secara molekuler sangat penting karena penyebaran utama AMR dikaitkan dengan akuisisi gen horizontal. Nanopore MinION adalah perangkat sekuensing portabel seukuran saku yang harganya yang terjangkau dan mampu urutan DNA / RNA secara langsung tanpa melalui proses PCR. Persiapan sampel dapat dilakukan hanya dalam 30-60 menit dan hasilnya dianalisis secara real-time. Dengan penggunaan minION, ratusan patogen serta *antimicrobial resistance gene* (ARG) dapat diidentifikasi. Penerapan MinION diharapkan mampu membantu dalam upaya pengendalian infeksi dan penatalaksanaan antimikroba bagi kesehatan manusia, hewan, dan lingkungan. Diharapkan dengan adanya sekuensing dengan minION membantu pemerintah Indonesia dalam mendeteksi, merespons, dan mengendalikan AMR.

Tujuan dari proyek percontohan Nanopore adalah untuk menguji dan mengoptimalkan integrasi sistem Oxford Nanopore Minion ke dalam pengujian resistensi antimikroba yang ada di laboratorium

MATERI DAN METODE

MATERI

Alat yang digunakan pada mikropipet, mikrotube, *Nanodrop Spectrophotometer* (Thermo Scientific), *PCR plate cooler*, *MinION sequencing device* (Oxford Nanopore Technologies), *vial colorless*, *vial DNA LoBind*, dan *vial Protein LoBind*. *Nuclease-free water*, *SQK-LRK001 Field Sequencing Kit* (Oxford Nanopore Technologies), *EXP FLP001 Flow Cell Priming Kit* (Oxford Nanopore Technologies), *EXP WSH002 Flow Cell Wash Kit* (Oxford Nanopore Technologies), dan *MinION Flow Cell* (Oxford Nanopore Technologies). *PowerWater DNA kit extraction* (Qiagen).

METODE

Pengumpulan sampel

Air limbah dari rumah pemotongan hewan (n=2) yaitu RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput, kota Bogor, sampel diambil sebanyak 2 liter dengan cara diambil 300 mL 7 kali dengan perbedaan 5 menit setiap kali pengambilan sampel. Sampel dikumpulkan dari 20 - 30 cm di bawah permukaan air. Pengukuran suhu, pH, dan kandungan klorin dilakukan dari setiap sampel yang dikumpulkan. Sampel sebanyak 600 mL digunakan untuk sekuensing metagenomik dengan Nanopore, Sampel yang belum digunakan disimpan pada suhu 4 - 8 °C

Ekstraksi DNA - Metagenomik

Sebanyak 600 mL sampel disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm. Membran filter dimasukkan ke dalam *PowerWater DNA bead tube* dengan menggunakan penjepit steril. Setelah ditambahkan 1ml larutan PW1 ke *PowerWater DNA bead tube*, kemudian divortex dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Tabung di sentrifuse dengan kecepatan 4000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tube 2ml yang bersih kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Sebanyak 200 µl Solusi IRS ditambahkan kemudian divortex dan di inkubasi pada 2-8 ° C selama 5 menit. Tabung disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit. Sebanyak 650 µl PW3 ditambahkan. Sebanyak 650 µl supernatan dimasukkan ke dalam spin column kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit. Tempatkan Filter MB *Spin Column* ke dalam *tube collection* 2 ml yang bersih. Kemudian sebanyak 650 µl PW4 ditambahkan dan disentrifuge pada 13.000 x g selama 1 menit. Untuk elusi sebanyak 100 µl EB ditambahkan pada posisi tengah membran filter kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit. Jika DNA akan di gunakan dalam seminggu maka simpan pada suhu 4 ° C, jika DNA akan

dipakai untuk waktu yang masih lama sebaiknya disimpan dalam freezer (-20°C hingga -80°C).

Pemeriksaan Kualitas DNA

Menggunakan *Nanodrop Spektrophotometer*, dilakukan uji terhadap konsentrasi dan kemurnian DNA.

Persiapan DNA untuk sekuensing metagenomik

Untuk memulai persiapan sekuensing Minion, dibutuhkan $\sim 400\text{ng}$ DNA genom dalam $10\ \mu\text{l}$ cairan. Untuk mengetahui kualitas *flowcell MinION* perlu dilakukan uji terhadap *active pores* pada *flowcell* tersebut. Jika pori-pori aktif kurang dari 800 disarankan untuk mengganti *flowcell*. Kit yang digunakan untuk sekuensing metagenomik adalah *rapid field sequencing*. Pada kit tersebut terdapat tiga buah tabung kecil yang didalamnya sudah terkandung beberapa reagen. Sebanyak $10\ \mu\text{l}$ DNA dimasukkan ke dalam tube 1. Dengan pipet DNA dihomogenkan dengan reagen yang dalam dalam tube. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan kemudian pada 80°C selama 1 menit. Untuk pemasangan adaptor, menggunakan ujung pipet kosong yang bersih, kertas timah dilubang dari tabung 2 kemudian sebanyak $10\ \mu\text{l}$ DNA dipindahkan cairan dari tube 1 ke tube 2. Kemudian inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Dengan menggunakan ujung pipet kosong yang bersih foil tube 3 dibuka. Sebanyak $65\ \mu\text{l}$ *Resuspension Buffer* (RTB) ditambahkan ke dalam tube 3.

Sekuensing metagenomik

Setelah *flowcell* selesai dilakukan pengecekan sehingga siap untuk digunakan, tutup *priming port* dari *flowcell* dibuka searah jarum jam sehingga *priming port* terlihat. *Priming mix* dibuat dengan menambahkan $30\ \mu\text{l}$ FLT ke tabung FLB. Sebanyak $800\ \mu\text{l}$ *priming mix* dimasukkan melalui *priming port* dan didiamkan dalam suhu kamar selama 5 menit. Sebanyak $65\ \mu\text{l}$ larutan ditambahkan dari tube 3 ke dalam tube 2. Sebanyak $75\ \mu\text{l}$ sampel (campuran dari tube 2 dan tube 3) dimasukkan ke dalam *flowcell* melalui *sampel port* (SpotON) dengan cara *dropwise*. Dengan perlahan pasang kembali penutup *sampel port*.

Analisis bioinformatik

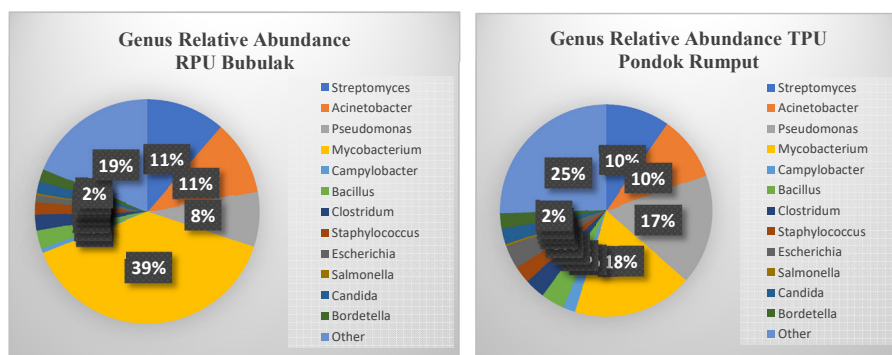
Untuk analisa bioinformatik dilakukan dengan cara menggunggah data hasil sekuensing dalam bentuk *FASTQ file* ke dalam software EPI2ME.

HASIL

Munculnya resistensi antibiotik pada manusia menjadi ancaman kesehatan masyarakat global yang sangat signifikan dan terus berkembang. Munculnya dan penyebaran *antimicrobial resistance gene* (ARG) telah mengangkat masalah kesehatan masyarakat menjadi suatu hal yang serius. Rumah potong hewan sebagai salah satu penghubung antara dunia peternakan dan manusia memiliki keragaman mikroba sangat besar, hal tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran ARG dengan cara *horizontal Gen Transfer* (HGT).

Teknologi sequencing generasi ketiga, termasuk Pacific Biosciences (PacBio) dan Oxford Nanopore, mampu menghasilkan pembacaan sekuen yang cukup panjang (Karlson *et al.*, 2015) dibandingkan dengan Platform PacBio, MinION memiliki kelebihan menghasilkan data mentah secara real time dan proses sekuensing menjadi lebih mudah karena proses pengerjaan sekuensing tanpa di dahului dengan proses PCR sehingga lebih cepat dan efisien termasuk untuk deteksi struktural yang sangat kompleks (Che *et al.*, 2019).

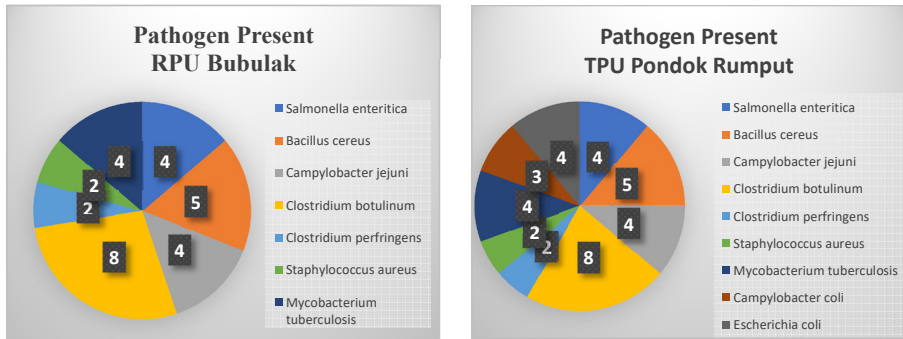
Seperti terlihat pada gambar 1 sekuensing metagenomik dengan alat MinION Nanopore mampu melakukan proses sekuensing dengan cepat, memberikan profil genetik serta melacak host ARG, khususnya untuk potensi patogen pembawa ARG dari sampel lingkungan di RPU. Dari diagram tersebut MinION mempunyai kemampuan untuk melakukan deteksi terhadap berbagai macam mikroorganisme yang ada dalam sampel air dari RPU. Berdasarkan persentase hampir mikroorganisme yang ditemukan adalah bakteri (76%), eukariot (21%), archaea (2%) dan virus (<1%). Pada RPU Bubulak komposisi mikroroganisme berdasarkan genus yang didapatkan adalah Mycobacterium (39%), Streptomyces (19%), Campylobacter (11%), Acinetobacter (11%), Pseudomonas (8%), Escherichia (2%), Salmonella (3%), Clostridium (2%), Bacillus (1%) mikroorganisme yang lain (3%). Sedangkan pada TPU Pondok Rumput mikroorganisme yang berhasil ditemukan adalah bakteri (98%), eukariot (2%), archaea (<1%) dan virus (<1%). Pengelompokan mikroorganisme berdasarkan genus didapatkan hasil Mycobacterium (18%), Streptomyces (10%), Campylobacter (25%), Acinetobacter (10%), Pseudomonas (17%), Escherichia (4%), Salmonella (3%), Clostridium (2%), Bacillus (2%) mikroorganisme yang lain (9%).



Gambar 1. Persentase keberadaan bakteri hasil sekuensing metagenomik

Dari total 34 genus bakteri yang teridentifikasi dengan MinION, ditemukan beberapa spesies pada RPU Bubulak yakni *Salmonella enteritica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* dan *Mycobacterium tuberculosis*. Sedangkan pada TPU

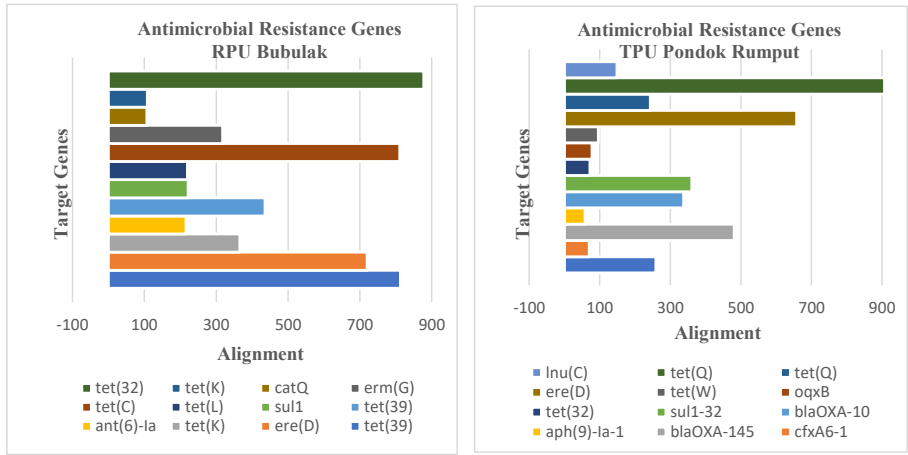
Pondok Rumput bakteri yang bersifat pathogen yang ditemukan diantaranya *Salmonella enteritica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O15.



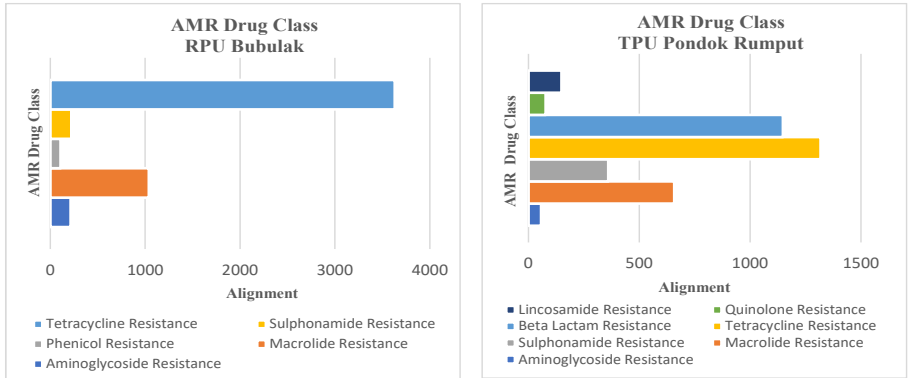
Gambar 2. Keberadaan bakteri pathogen hasil sekuensing metagenomik

Berdasarkan gambar 3 terlihat bahwa *Antimicrobial resistance gene* (ARG) yang terdeteksi pada sampel tersebut adalah tet(39), ere(D), tet(K), ant(6)-Ia, tet(39), sul1, tet(L), tet(C), erm(G), catQ, tet(K) dan tet(32). Sedangkan pada sampel TPU Pondok Rumput beberapa kelompok bakteri sudah bersifat resisten terhadap setidaknya 7 golongan antibiotik diantaranya aminoglycoside, macrolide, sulphonamide, tetracycline, beta lactam, quinolone dan lincosamide. Gen penyandi resistensi antibiotik yang terdeteksi oleh MinION antara lain blaOXA-118, cfxA6-1, blaOXA-145, aph(9)-Ia-1, blaOXA-10, sul1-32, tet(32), oqxB, tet(W), ere(D), tet(Q) dan tet(Q).

Berdasarkan hasil sequencing menggunakan MinION, sejumlah bakteri dari RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput telah resisten terhadap lebih dari 5 golongan antibiotik. Dari gambar 4 dapat dilihat bahwa pada RPU Bubulak bakteri yang ditemukan telah bersifat resisten terhadap setidaknya 5 golongan antibiotik yaitu tetrasiklin, phenicol, aminoglikosida, sulfonamide dan makrolida. Sedangkan pada TPU Pondok Rumput bakterinya sudah ditemukan sudah resisten setidaknya terhadap 7 golongan antibiotika diantaranya lincosamid, beta laktam, sulfonamid, aminoglikosida, makrolida dan tetrasiklin.



Gambar 3. *Antimicrobial Resistance Genes* (ARG) pada RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput



Gambar 4. *Antimicrobial Resistance* berdasarkan golongan antibiotik pada RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput.

PEMBAHASAN

Dengan kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba/ Antimicrobial Resistance Genes (ARG), MinION diharapkan mampu mempercepat diagnosa dan penyajian profil resistensi. Dari hasil sekuensing dengan menggunakan alat ini diperoleh profil bakteri termasuk di dalamnya bakteri patogen dan beserta informasi mengenai profil resistensi pada masing-masing bakteri. Kemampuan untuk mengidentifikasi dan mengukur spesies menjadi aplikasi penting terutama dalam bidang kesehatan dan peternakan (Peel et al., 2019). Proses sekuensing metagenomik dan pengurutan seluruh genom semakin banyak digunakan untuk diagnostik dan laboratorium klinis untuk mendeteksi organisme patogen dan potensi ARG yang dibawanya (Deshpande *et al.*, 2019).

Pada awal penggunaan antibiotik diasumsikan bahwa terminologi *antimicrobial resistance* (AMR) tidak mungkin terjadi (Van Hoek *et al.*, 2011). Sayangnya, waktu telah membuktikan sebaliknya. Awalnya tidak ada yang mengantisipasi mikroba akan bereaksi terhadap serangan berbagai bahan kimia dalam antibiotik dengan menyesuaikan diri di lingkungan serta mengembangkan sifat resistensi terhadap antibiotik menggunakan berbagai macam mekanisme. Selain itu, kemampuan mereka untuk bertukar gen, yang sekarang dikenal sebagai *horizontal gen transfer* (HGT) menegaskan bahwa resistensi sebenarnya dimulai muncul bahkan sebelum antibiotik pertama penisilin ditemukan (Van Hoek *et al.*, 2011).

Mikroba menjadi resisten terhadap antimikroba melalui sejumlah mekanisme diantaranya permeabilitas berubah pada dinding sel bakteri yang membatasi akses antimikroba ke situs target, pengeluaran aktif antibiotik dari sel mikroba, modifikasi enzimatis dari antibiotik, degradasi agen antimikroba, akuisisi jalur metabolisme alternatif untuk mereka yang dihambat oleh obat, modifikasi target antibiotik, overproduksi enzim target (Wright 2005).

Identifikasi bakteri yang bersifat patogen juga sangat diperlukan karena adanya mekanisme antimicrobial resistance patogen (ARP) diperlukan selalu melakukan kontrol terhadap bakteri patogen apa saja yang dalam sampel lingkungan RPU sebagai data dasar untuk mengetahui sejauh mana RPU mempunyai potensi untuk penyebaran ARG secara luas ke dalam lingkungan. Selain itu identifikasi ARP diperlukan untuk kontrol patogen yang efektif dalam pengolahan air limbah. Sifat real-time dan kecepatan dalam pembacaan sekuensing Nanopore memungkinkan untuk melakukan proses identifikasi sekaligus pelacakan terhadap ARP potensial dalam IPAL (Che *et al.*, 2019). Seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Gen resistensi antimikroba dalam sebuah sampel dapat diidentifikasi dari data metagenomik (Wang *et al.*, 2016). Dari hasil sekunsing dengan minION diperoleh hasil mikroba sudah mengalami resisten terhadap 8 golongan antibiotik diantaranya aminoglycoside, macrolide, phenicol, sulphonamide, tetracycline, beta lactam, quinolone dan lincosamide. Sifat resisten terhadap golongan aminoglycoside dibawa oleh ARG APH(9)-la yang banyak ditemukan pada bakteri *Enterococcus* dan *Escherichia* (Van Hoek *et al.*, 2011). Sifat resistensi terhadap golongan macrolide setidaknya dibawa oleh 2 ARG yaitu ere(D) dan erm(G) dimana ere(D) banyak ditemukan pada *Bacillus* dan *Salmonella* sedangkan erm(G) banyak ditemukan pada *Bacillus*, *Bacteroides*, *Catenibacterium*, *Lactobacillus* (Van Hoek *et al.*, 2011). ARG penyebab resistensi terhadap golongan quinolone dibawa oleh oqxB ditemukan pada *Escherichia coli* (Hansen 2004). Gen pembawa sifat resistensi pada golongan phenicol yang diperoleh adalah catQ yang banyak ditemukan pada *Clostridium* dan *Streptococcus*. Resistensi terhadap golongan tetracycline dibawa oleh keberadaan banyak ARG, setidaknya ada 6 gen pembawa resistensi yang ditemukan yaitu tet(32), tet(W), tet(Q), tet(39), tet(L), tet(C) yang banyak ditemukan pada 23 genus bakteri diantaranya yang bersifat patogen

seperti *Enterococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Vibrio* dan 13 genus bakteri lainnya (Van Hoek *et al.*, 2011). Untuk golongan sulphonamide hanya ditemukan 1 ARG yaitu *sul1* yang terdapat pada kelompok bakteri *Salmonella* (Antunes 2005). Resistensi terhadap golongan antibiotik beta lactam dibawa oleh 4 ARG yaitu *blaOXA-11*, *blaOXA-145*, *blaOXA-10* dan *cfxA6-1* yang banyak terdapat pada *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* dan *Streptococcus* (Hoang Quoc *et al.*, 2019)

Dari hasil analisis baik terhadap keberadaan ARG maupun sifat resistensi mikroba terhadap golongan antibiotika sangat beragam dan masing-masing memiliki pola tersendiri yang tidak sama apabila dibandingkan antar RPU. Hal ini dapat dijadikan dasar bahwa perkembangan resistensi antimikrobial sudah sangat luas terbukti dengan adanya mikroba-mikroba yang mempunyai resistensi bahkan terhadap dua atau lebih golongan antibiotika. Mengetahui hal ini perlu ditekankan bahwa idealnya, memonitor kondisi resistensi yang cepat untuk karakterisasi beragam ARG yang ditemukan di lingkungan yang berbeda sangat dibutuhkan (Arango-Argoty *et al.*, 2019.)

Skema pemeringkatan yang dikembangkan baru-baru ini telah mengusulkan bahwa ARG yang ditemukan dalam mikroba pathogen harus diklasifikasikan sebagai ARG berisiko tinggi, sementara resistensi pada spesies bakteri tertentu yang tidak bersifat pathogen akan dianggap hanya sebagai penanda keberadaan bakteri tersebut. Semua hasil sekuen yang memberikan informasi mengenai ARG harus ditelusuri asal taksonomi atau genetik mereka untuk mengevaluasi risiko yang terkait dengan ARG di lingkungan serta potensi penularannya ke manusia. Dengan menggunakan pendekatan ini, dimungkinkan untuk mendeteksi inang bakteri ARG terutama yang berkaitan erat dengan penyakit pada manusia serta proses pengobatannya (Kamatthewatta *et al.*, 2019).

Pemetaan mikroba yang sudah menunjukkan sifat resistensi terhadap beberapa antibiotik penting secara klinis. Penyebaran mikroba inidi lingkungan, terutama genangan air mengkhawatirkan karena karena bahan genetik dari mikroba ini dapat ditransmisikan dari bakteri yang hidup dalam limbah cair yang berasal dari rumah pemotongan hewan ke lingkungan dan akhirnya ke manusia melalui rantai makanan yang terkontaminasi. Ini bisa menjadi sumber infeksi yang tidak dapat diobati pada manusia dan hewan.

Pengurangan konsumsi antibiotik tidak akan cukup untuk mengendalikan resistensi antimikroba karena penularan melalui penyebaran gen resistansi (ARG) tampaknya menjadi faktor penyumbang dominan dalam peningkatan kasus resistensi. Meningkatkan sanitasi, meningkatkan akses ke air bersih, dan memastikan tata kelola RPU dan peternakan yang baik, meningkatkan pengembangan terhadap pengujian resistensi antimikrobial serta mengatur sektor kesehatan dan peternakan dengan lebih baik terutama dalam pengendalian

pemakaian antibiotik semuanya diperlukan untuk mengurangi resistensi antimikroba global (Collignon 2018).

Teknik sekuensing dengan MinION dapat memberikan gambaran yang komprehensif untuk mengetahui profil patogen cepat dari sampel tanpa kultur serta mampu memberikan informasi yang cukup mengenai keberadaan ARG (Schmidt *et al.*, 2017). Untuk memvalidasi hasil sekuensing dengan MinION dengan menggunakan DNA yang sama dilakukan sekuensing dengan PacBio dengan akurasi > 99%) dari dua metode sekuensing (Van der Helm *et al.*, 2017). Hal ini memberikan bukti bahwa sekuensing dengan MinION memberikan hasil yang sama baiknya dengan metode sekuensing yang lain.

SIMPULAN DAN SARAN

Metode sekuensing metagenomik dengan menggunakan MinION mampu memberikan banyak informasi diantaranya keberadaan berbagai mikroba, mengidentifikasi mikroba patogen, *antimicrobial resistance gene* (ARG) yang terdapat pada mikroba serta sifat resistensi mikroba tersebut pada beberapa golongan antibiotik. Hasil analisis baik terhadap keberadaan ARG maupun sifat resistensi mikroba terhadap golongan antibiotika sangat beragam dan masing-masing memiliki pola tersendiri yang tidak sama apabila dibandingkan antar RPU. Hal ini dapat dijadikan dasar bahwa perkembangan resistensi antimikroba sudah sangat luas terbukti dengan adanya mikroba-mikroba yang mempunyai sifat resistensi bahkan terhadap dua atau lebih golongan antibiotika.

Diperlukan analisis bioinformatika lebih lanjut untuk mendalami mengenai mekanisme kerja dari ARG dalam penyebaran sifat resistensi.

DAFTAR PUSTAKA

- Antunes, P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 836–839.
- Arango-Argoty GA., Dai D, Pruden A. 2019. NanoARG: a web service for detecting and contextualizing antimicrobial resistance genes from nanopore-derived metagenomes. *Microbiome* 7, 88.
- Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, Stahl SE, Rubins KH, McIntyre ABR, Dworkin, JP, Lupisella ML, Smith DJ, Botkin DJ. 2017. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the International Space Station. *Sci. Rep.*
- Che, Y, Xia Y, Liu L. 2019. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome* 7, 44.

- Collignon P, John Jb, Timothy RW, Sumanth G, Ramanan L. 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health* 2018; 2: 398-405.
- Deshpande, Reed, Sullivan, Raymond, Kerkhof, Beigel, Wade. (2019). Offline Next Generation Metagenomics Sequence Analysis Using MinION Detection Software (MINDS). *Genes*. 10. 578.
- Hansen, LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3332–3337.
- Hoang Quoc C, Nguyen TP, Nguyen T, Duc H, Tran LT, Tran TT, Nguyen TS, Phan TL. 2019. Carbapenemase Genes and Multidrug Resistance of *Acinetobacter Baumannii*: A Cross Sectional Study of Patients with Pneumonia in Southern Vietnam. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3), 148.
- Kamatheewatta KI, Bushell RN, Young ND, Stevenson MA, Billman-Jacobe H. 2019 Exploration of antibiotic resistance risks in a veterinary teaching hospital with Oxford Nanopore long read sequencing. *PLOS ONE* 14(5).
- Karlsson E, Lärkeryd Adrian, Sjödin A, Forsman M, Stenberg P. 2015. Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Scientific reports*.
- Peel N, Dicks L, Heavens D, Percival-Alwyn L, Cooper C, Clark M, Davies R, Leggett R, Yu D. 2019. Semi-quantitative characterisation of mixed pollen samples using MinION sequencing and Reverse Metagenomics (RevMet).
- Reddington K, David E, Justin O, Devin MD, Lars HH, Tue KN, Anne-Lise D, Richard ML, Darren H, Ned P, Terrance PS, Anthony B, Spyridon O, Ioannis R, Thomas B, Eric VDH, Dino J, Hollian R, Hans J, John RT, Miten J, Bonnie LB. 2020. Metagenomic analysis of planktonic riverine microbial consortia using nanopore sequencing reveals insight into river microbe taxonomy and function, *GigaScience*, Volume 9, Issue 6.
- Russell JA, Campos B, Stone J, Blosser EM, Burkett-Cadena N, Jacobs JL. 2018. Unbiased strain-typing of Arbovirus directly from mosquitoes using Nanopore sequencing: A field-forward biosurveillance protocol. *Sci. Rep*.
- Schmidt K, Mwaigwisya L, Crossman M, Doumith D, Munroe C, Pires A, Khan N. Woodford NJ, Saunders J, Wain J, O’Grady D, Livermore M. 2017. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 72, Issue 1, January 2017, Pages 104–114.
- van der Helm, E, Imamovic L, Hashim E, van Schaik W, Koza A, Sommer M. 2017. Rapid resistome mapping using nanopore sequencing. *Nucleic acids research*, 45(8), e61.

- Van Hoek, AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 203.
- Wang K, Li P, Lin Y, Chen H, Yang L, Li J, Zhang T, Chen Q, Li Z, Du X, Zhou Y, Li P, Wang H, Song H. 2020. Metagenomic Diagnosis for a Culture-Negative Sample From a Patient With Severe Pneumonia by Nanopore and Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10. 182.
- Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1451–1470.