

**ANALISIS GEN *catP* YANG MENYANDI RESISTENSI
TERHADAP KLORAMFENIKOL PADA *Salmonella*
typhi ISOLAT JAYAPURA DENGAN MENGGUNAKAN
TEKNIK PCR**

**HIELDA
N121 07 014**



PERPUSTAKAAN PUSPITA	
Tgl. Terima	22-12-09
Arahan	farmasi
Berkas	12107014
Waktu	12107014
Peny. Investigasi	Hy
M. No.	

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

**ANALISIS GEN *catP* YANG MENYANDI RESISTENSI TERHADAP
KLORAMFENIKOL PADA *Salmonella typhi* ISOLAT JAYAPURA
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK PCR**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**HIELDA
N121 07 014**

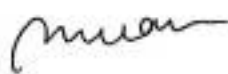
**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

ANALISIS GEN *catP* YANG MENYANDI RESISTENSI TERHADAP
KORAMFENIKOL PADA *Salmonella typhi* ISOLAT JAYAPURA DENGAN
MENGUNAKAN TEKNIK PCR

HIELDA
N121 07 014

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP.19670319 199203 2 002

Pembimbing Pertama



Prof. dr. Moch.Hatta, MD, Sp.MK, Ph.D
NIP. 19570416 198503 1 001

Pada tanggal, 16 Desember 2009



ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian analisis gen *catP* yang menyandi resistensi terhadap kloramfenikol pada *Salmonella typhi* isolat Jayapura dengan menggunakan teknik PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya resistensi *Salmonella typhi* terhadap kloramfenikol dari sampel darah penderita suspek demam tifoid dengan menggunakan teknik PCR. Uji PCR didasarkan pada keberadaan Gen *catP*. Jumlah sampel yang digunakan adalah 67 sampel. Penelitian ini menggunakan metode dekskriptif. Hasilnya 25 sampel didapatkan positif *Salmonella typhi* dengan teknik PCR, dari 25 sampel yang diuji terdapat 6 sampel yang resisten terhadap kloramfenikol dan 19 sampel yang sensitif.

ABSTRACT

A research has been done about *catP* gene analysis that code the resistance of chloramphenicol of *Salmonella typhi* from Jayapura isolate using PCR technique. The aim of this research is to know the resistance of *Salmonella typhi* to chloramphenicol from blood sample of typhoid fever suspect using PCR technique. PCR test based on the presence of *catP* gene. Total amount of samples are 67. The research is using descriptive method. The results show that 25 samples are positive *Salmonella typhi* with PCR technique, from that 25 samples tested, 6 are resistance to chloramphenicol and 19 sample are sensitive.



UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah, tiada kata yang patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Mengetahui, Pemilik segala Ilmu, karena atas petunjuk-Nya Maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir ini banyak kendala dan hambatan yang dihadapi. Namun berkat dukungan dan bantuan semua pihak dan seizin Tuhan Yang Maha Kuasa, penyusunan tugas akhir ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, penulis dengan segala kerendahan dan ketulusan hati menghaturkan banyak terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt selaku pembimbing utama dan Bapak Prof. dr. Moch. Hatta. MD, Sp.MK, Ph.D selaku pembimbing pertama yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya dalam membimbing dan memberi petunjuk yang begitu berharga dari awal persiapan penelitian hingga selesainya penulisan skripsi ini.

Tak lupa penulis haturkan terima kasih kepada bapak Rektor beserta jajarannya, Ibu Dekan fakultas Farmasi beserta Jajarannya, ketua program konsentrasi TLK beserta staf, Bapak Kepala Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran UNHAS beserta

stafnya terutama kepada P'Rommy Usman yang selalu membimbing dan mendampingi selama penelitian.

Juga teman-teman Baronang TLK 07 dan terutama teman seperjuangan "STT Jayapura", Hamid, Purwaningsih, Rinny Amra, dan Rini kelanit yang banyak bersama dalam suka dan duka selama penelitian terima kasih atas kerjasama dan kekompakan yang tidak akan terlupakan.

Terima kasih juga yang tiada terhingga kepada kedua Orang tua tercinta H. Abdullah Zain dan Hj. Talha yang selalu memberikan dukungan moril dan materiel serta doa tiada henti demi kesuksesan penulis, saudara-saudaraku tersayang, liet, Anief, Nana do'o, Tyo si'A' dan tak lupa juga penulis ucapkan terima kasih khusus untuk Novel Badawi yang selalu memotivasi, mendengarkan keluh-kesah, juga menemani dan sabar menunggu selama penulis menyelesaikan skripsi ini. Tak lupa juga pada teman-teman pondokan bu dosen Astu, Eka, Unieq, Ammah, Injam, Thimun, Thinthonk dan semua yang tak tercantumkan namanya satu persatu.

Semoga segala bantuan, petunjuk dorongan dan pengorbanan yang telah diberikan demi terselsaikannya skripsi ini, bernilai ibadah dan memperoleh imbalan yang berlipat ganda di sisi Allah SWT, amin.

Akhirnya, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan serta di berkati oleh Tuhan yang maha Esa. Amin.

Makassar, 16 Desember 2009

HIELDA



DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENUNJUK SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 <i>Salmonella thypi</i>	5
II.2 Struktur Antigen	6
II.3 Demam Tifoid	8
II.3.1 Diagnosis Demam Tifoid.....	8
II.4 Antibiotik	10
II.4.1 Jenis antibiotik.....	11
II.5 Resistensi antibiotik	13

II.5.1 Mekanisme Resistensi Mikroba.....	14
II.5.2 Asal Resistensi Antibiotik	16
II.5.3 Pengujian Resistensi Antibiotik.....	18
II.6 Kloramfenikol	20
II.7 Plasmid Resisten Kloramfenikol Dan Gen <i>catP</i>	21
II.8 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	23
II.8.1 Jenis-jenis PCR	25
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	26
III.1 Jenis Penelitian	26
III.2 Waktu Dan Tempat Penelitian	26
III.3 Populasi Penelitian Dan Sampel Penelitian	26
III.3.1 Populasi Penelitian	26
III.3.2 Sampel Penelitian.....	26
III.3.3 Kriteria Sampel.....	27
III.4 Alat	27
III.5 Bahan.....	27
III.6 Prosedur Kerja	28
III.6.1 Uji Widal	28
III.6.2 Uji kultur Darah	28
III.6.3 Teknik PCR	29
III.6.3.1 Ekstraksi DNA <i>Salmonella thypi</i> Dengan Metode Boom	29
III.6.3.2 Deteksi DNA <i>Salmonella thypi</i> (Gen <i>Flagellin</i>) Dengan Metode PCR	30

III.6.3.3 Deteksi Gen <i>catP</i> <i>Salmonella thypi</i> Dengan PCR.....	31
III.6.3.4 Elektroforesis Gel	32
III.7 Defenisi Operasional	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
IV.1 Hasil Penelitian	34
IV.2 Pembahasan	36
BAB V PENUTUP	39
V.1 Kesimpulan	39
V.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil uji kultur, <i>Nested PCR</i> dan gen <i>catP</i> pada <i>Salmonella typhi</i>	34
2. Tabel Data Sampel Penelitian.....	48
3. Gambaran umum penderita demam tifoid berdasarkan jenis kelamin dan umur.....	51
4. Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Suhu Tubuh.....	52
5. Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Lama Demam.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi <i>Salmonella typhi</i>	5
2. Mekanisme aktivitas antibiotik.....	13
3. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik.....	18
4. Struktur kloramfenikol.....	21
5. Urutan gen <i>catP</i> dengan Accession Number: U46780.....	22
6. Gambar Hasil Elektroforesis Produk PCR Gen <i>catP</i>	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi <i>Salmonella typhi</i>	5
2. Mekanisme aktivitas antibiotik.....	13
3. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik.....	18
4. Struktur kloramfenikol.....	21
5. Urutan gen <i>catP</i> dengan Accession Number: U46780.....	22
6. Gambar Hasil Elektroforesis Produk PCR Gen <i>catP</i>	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja / Alur penelitian.....	43
2. Isolasi Dan Identifikasi <i>Salmonella typhi</i>	44
3. Isolasi DNA <i>Salmonella typhi</i> dengan Metode Boom.....	45
4. Deteksi DNA <i>Salmonella typhi</i> dengan <i>nested</i> PCR.....	46
5. Deteksi Gen <i>catP</i>	47
6. Tabel Data Sampel Penelitian.....	48
7. Gambaran umum penderita demam tifoid berdasarkan jenis kelamin dan umur.....	51
8. Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Suhu Tubuh.....	52
9. Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Lama Demam.....	53
10. Bahan – Bahan Untuk Isolasi DNA.....	54
11. Lampiran Foto.....	57

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
°C	Derajat Celcius
DNA	Deoxribonuleic Acid
dNTP	Denucleotidetriphosphat
DT	Demam Tifoid
EDTA	Etilen Diamine Tetra Aceticacid
EtBr	Ethidium bromida
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
Fg	Femto gram
GuSCN	Guanidium thiocyanate
HCl	Asam Chlorida
H ₂ S	Asam disulfida
KCN	Kalium cyanate
M	Molaritas
MDR	Multi Drug Resistensi
MgCl ₂	Magnesium Chlorida
mM	mili Molar
mRNA	Massenger Ribonucleic Acid
MR-VP	Methyl Red – Voges Proskaver

NCCLS	National Commite For Clinical Laboratory Standart
<i>n</i> PCR	<i>nested</i> Polymerase Chain Reaction
PABA	p-aminobenzoat acid/asam para-aminobenzoat
PBP	Penicillin Binding Protein
QC-PCR	Quantitative Comparative-PCR
RFLP-PCR	Restriction Fragmen Length Polymorpism-PCR
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Revolution per menit
RTF	Resistance Transfer Factor
SIM	Sulfit Indol Motility
SSA	Salmonella Shigella Agar
ST1	Salmonella typhi 1
ST2	Salmonella typhi 2
ST3	SalmPonella typhi 3
ST4	Salmonella typhi 4
TBE	Tris Boric EDTA
TSIA	Triple Sugar Iron Agar
UV	Ultra Violet
ul	Mikro liter

BAB I

PENDAHULUAN

Pemakaian obat antimikroba spektrum luas yang mendunia selama dua dekade terakhir menyebabkan antara lain munculnya resistensi antimikroba (1). Kecepatan berkembangnya resistensi pada bakteri telah ditemukan meningkat pada beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri termasuk penyebab tifoid spesies *Salmonella* yang sekarang menjadi resisten terhadap satu atau lebih jenis antibiotik (2). Kasus multi drug resistant (MDR) *Salmonellas typhi* meningkat secara tajam dapat ditemukan di daerah epidemi meliputi China, Asia Tenggara dan India. Resistensi kloramfenikol pertama kali dilaporkan terjadi di Amerika tengah pada awal tahun 1970-an (3).

Menurut Hadinegoro SR (4), mekanisme terjadinya resistensi antibiotik antara lain karena penurunan permeabilitas terhadap antibiotik, proses enzimatik yaitu proses inaktivasi obat oleh enzim, modifikasi letak reseptor obat dan peningkatan sintesa metabolik antagonis terhadap antibiotka. Resistensi *Salmonella typhi* terhadap kloramfenikol dapat terjadi melalui 2 cara yaitu perantara plasmid dan terjadinya mutasi ribosomal serta penurunan permeabilitas.

Di Indonesia, kloramfenikol masih merupakan obat pilihan utama dalam pengobatan demam tifoid (5). Kloramfenikol merupakan penghambat kuat terhadap sintesis protein mikroba yang bersifat

bakteriostatik, dan pertumbuhan mikroorganisme berlanjut ketika obat dihentikan.

Salmonella typhi yang resisten terhadap kloramfenikol menghasilkan enzim *Chloramphenicol acetyltransferase (cat)*. Produksi enzim tersebut diatur oleh suatu plasmid yang mengandung gen *catP* yaitu gen yang mengkode sintesis enzim *chloramphenicol acetyltransferase* suatu enzim intraseluler yang mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan asetoksikloramfenikol sehingga kloramfenikol menjadi nonaktif (6,7,8).

Penentuan kerentanan patogen bakteri terhadap antibiotik dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode utama : dilusi dan difusi, sesuai dengan standar *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram (*disc diffusion*) (7). Prosedur diagnostik konvensional tersebut membutuhkan waktu paling sedikit 1 minggu, selain itu kelemahan metode tersebut adalah sensitivitasnya yang rendah serta tidak mampu menguji resistensi sampai tingkat gen (9). Beberapa teknik dibidang biologi molekuler yang mendasar telah dikembangkan untuk melacak adanya urutan DNA yang spesifik dari mikroorganisme tertentu dimana hal ini memungkinkan untuk dipakai sebagai sarana diagnostik. Teknik tersebut lazimnya disebut dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, dimana saat ini dipakai sebagai sarana diagnostik dan skrining pada penderita dengan infeksi mikroba (10).

Berdasarkan laporan riset kesehatan dasar nasional oleh Depkes RI (2007) yang melaporkan bahwa prevalensi tifoid klinis nasional sebesar 1,6% (rentang:0,3% - 3%). Sebanyak 12 provinsi mempunyai prevalensi di atas angka nasional, yaitu provinsi NAD, Bengkulu, Jawa Barat, Banten, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Sulawesi Selatan, Gorontalo, Papua Barat, dan Papua. Di 18 provinsi, kasus tifoid sebagian besar terdeteksi berdasarkan diagnosis oleh tenaga kesehatan, sedang di provinsi lainnya terutama berdasarkan gejala klinis. Prevalensi tifoid menurut diagnosis dan gejala, berdasarkan Kabupaten/Kota di Provinsi Papua,(Laporan Riskesdas Provinsi Papua 2008) ditemukan bahwa Jayapura dengan tingkat prevalensi tifoid 0,4% dan tertinggi ditemukan di Pegunungan Bintang (14,3%) sedangkan menurut diagnosis tenaga kesehatan tertinggi ditemukan di kabupaten Jayawijaya (2,8%) (11,12).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka akan dilakukan penelitian dengan rumusan masalah, yaitu mendeteksi resistensi *Salmonella typhi* terhadap Kloramfenikol pada darah penderita suspek demam tifoid isolat Jayapura dengan keberadaan gen *catP* menggunakan teknik PCR.

Tujuan Penelitian untuk mengetahui adanya resistensi *Salmonella typhi* terhadap kloramfenikol dengan keberadaan gen *catP* yang diisolasi dari darah penderita suspek demam tifoid di Jayapura-Papua.



Manfaat Penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai alat diagnosis resistensi secara cepat sehingga terapi antibiotik terhadap penderita demam tifoid dapat ditangani secepatnya.

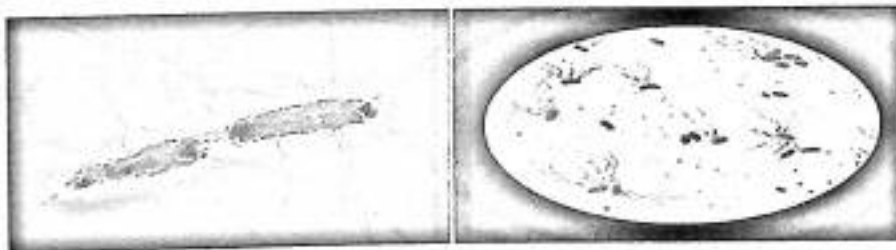
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, tidak berspora, ukuran 1-3,5 μm x 0,5-0,8 μm , besar koloni rata-rata 24 mm dan mempunyai flagella peritrikh. *Salmonella* tumbuh pada suasana aerob dan anaerob fakultatif pada suhu 15 - 41 $^{\circ}\text{C}$ (suhu pertumbuhan optimum 37,5 $^{\circ}\text{C}$)(13). pH pertumbuhan 6-8. Pada umumnya isolat *Salmonella* dikenal dengan sifat-sifat : gerak positif, reaksi fermentasi terhadap manitol sarbitol positif memberikan hasil negatif pada reaksi indol, DNase, fenilalanin deaminase, urease, Voges Proskauer, reaksi fermentasi pada sukrosa, laktosa, adonitol serta tidak tumbuh dalam larutan KCN.

Salmonella typhi hanya membentuk sedikit H_2S dan tidak membentuk gas pada fermentasi glukosa. Kuman mati pada suhu 56 $^{\circ}\text{C}$ juga pada keadaan kering. Dalam air biasa tahan selama 4 minggu. Hidup subur pada medium yang mengandung garam empedu.(14)



Gambar 1. Morfologi *Salmonella typhi* (Sumber : Mr.Arsooth. Genus *Salmonella*. [dikutip 30 Juni 2009]. Available from: www.vphcap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf)

Klasifikasi *Salmonella typhi* menurut Garrity dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (16):

Kingdom	: Procaryotae
Phylum	: Proteobacteria
Classis	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>

Untuk melakukan uji laboratorium diagnostik pada *Salmonella typhi* langkah-langkah yang dilakukan pertama yaitu pengambilan spesimen dapat berupa darah, aspirat sum-sum tulang, spesimen tinja, atau urin. Tahapan selanjutnya adalah penumbuhan *Salmonella* dari spesimen-spesimen dari pasien dalam medium pengaya untuk meningkatkan jumlah *Salmonella* dan menghambat pertumbuhan jenis *enterobacteriaceae* selain *Salmonella*. Setelah itu, kultur ditumbuhkan pada medium difrensial dan selektif untuk pengisolasian *Salmonella*. Selanjutnya, koloni-koloni hasil pertumbuhan pada medium dapat diidentifikasi melalui tes biokomia dan aglutinasi (7).

II.2 Struktur Antigen

Karakterisasi antigen berperan penting di dalam epidemiologi dan klasifikasi, khususnya pada genus tertentu seperti *Salmonella*, *Shigella*.

utama sel bakteri adalah: antigen somatik (O), antigen flagel (H), dan antigen kapsul (K).

1. Antigen Somatik (O)

Antigen O adalah bagian terluar dari Lipopolisakarida (LPS) dinding sel yang terdiri dari unit polisakarida yang berulang. Beberapa polisakarida spesifik mengandung gula yang unik. Antigen O resisten terhadap panas dan alkohol dan biasanya terdeteksi oleh aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terutama adalah IgM.

2. Antigen Flagella (H)

Antigen (H) merupakan protein termolabil terdapat di flagella dan didenaturasi atau dirusak oleh panas atau alkohol. Antigen ini dipertahankan dengan memberikan formalin pada varian bakteri yang motil. Antigen H seperti ini beraglutinasi dengan antibodi anti-H, terutama IgG. Penentu dalam antigen H adalah fungsi sekuens asam amino pada protein flagella (flagellin). Antigen H pada permukaan bakteri dapat mengganggu aglutinasi dengan antibodi anti O. antigen ini bersifat sangat imunogenik.

3. Antigen Kapsul (K)

Antigen K terletak diluar antigen O pada beberapa *Enterobacteriaceae* tetapi tidak semuanya. Berapa antigen K merupakan polisakarida. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi dengan antiserum O, dan dapat berhubungan dengan virulensi (7,17).

II.3 Demam Tifoid

Demam tifoid masih merupakan penyakit endemik di Indonesia. Penyakit ini termasuk penyakit menular yang tercantum dalam Undang-undang nomor 6 tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah. Surveilanse Departemen Kesehatan RI, frekuensi kejadian demam tifoid di Indonesia pada tahun 1990 sebesar 9,2 dan pada tahun 1994 terjadi peningkatan frekuensi menjadi 15,4 per 10.000 penduduk. Dari survey berbagai rumah sakit di Indonesia, dari tahun 1981 sampai dengan 1986 memperlihatkan peningkatan jumlah penderita sekitar 35,8%. Insiden demam tifoid bervariasi di tiap daerah.(1). Studi terakhir dari Asia tenggara mendapatkan bahwa insiden tertinggi terjadi pada anak dibawah usia 5-2 tahun. Kasus yang berujung pada kematian tidak lebih dari 1%, meskipun demikian, angka ini bervariasi di seluruh dunia. Di Pakistan dan Vietnam, dari pasien yang dirawat di rumah sakit, angkanya kurang dari 2%, sementara di beberapa area di Papua nugini dan Indonesia, angkanya mencapai 30-50%. Hal ini sebagian besar disebabkan karena tertundanya pemberian antibiotika yang tepat.(18)

II.3.1 Diagnosis Demam Tifoid

Tidak adanya gejala-gejala atau tanda yang spesifik untuk demam tifoid, membuat diagnosis klinik demam tifoid menjadi cukup sulit. Di daerah endemis, demam lebih dari 1 minggu yang tidak diketahui

penyebabnya harus dipertimbangkan sebagai demam tifoid sampai terbukti penyebabnya. Diagnosis pasti demam tifoid adalah dengan isolasi atau kultur *S.typhi* dari darah, sum-sum tulang, atau lesi anatomis yang spesifik. Adanya gejala klinis yang karakteristik demam tifoid atau deteksi respon antibody yang spesifik hanya menunjukkan dugaan demam tifoid tetapi tidak definitif atau pasti.

Beberapa pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk diagnosis demam tifoid yaitu :

1. Metode Kultur Mikrobiologi

Metode ini dapat mendeteksi *Salmonella typhi* melalui kultur bakteri dari spesimen darah, tinja, urin, sumsum tulang atau lesi anatomis tertentu. Kultur darah ini merupakan metode utama untuk diagnosis demam tifoid (19).

2. Metode Serologis

Metode serologis digunakan untuk mengetahui secara kualitatif maupun kuantitatif respon tubuh terhadap agen infeksius atau dapat pula digunakan untuk membedakan bakteri yang memiliki hubungan kekerabatan yang erat. Metode serologis memerlukan waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan kultur mikrobiologis. Metode serologis untuk diagnosis demam tifoid antara lain adalah tes ELISA, dipstick, tes Widal, tes Tubex®, tes typhidot, dan tes aglutinasi latex. Demam tifoid menginduksi respon imun humoral baik sistemik maupun lokal tetapi

respon imun ini tidak dapat meproteksi dengan lengkap terhadap kekambuhan dan reinfeksi (7,20).

3. Teknik Molekuler

Seperti halnya kultur darah, target dari teknik-teknik molekuler adalah patogen itu sendiri sehingga bermanfaat untuk deteksi awal penyakit. Teknik hibridisasi menggunakan probe DNA adalah teknik biologi molekuler pertama yang digunakan untuk diagnosis demam tifoid. Teknik ini memiliki spesifisitas yang tinggi namun kurang sensitif. Teknik ini tidak dapat mendeteksi *S.typhi* bila jumlah bakteri kurang dari 500 bakteri/ml. kemudian berkembang teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik (1-5 bakteri/ml). PCR untuk identifikasi *S.typhi* ini tersedia di beberapa Negara namun penggunaannya masih terbatas untuk penelitian karena harganya yang cukup mahal. Selain itu diperlukan kehati-hatian dalam menginterpretasi hasil pemeriksaan teknik molekuler termasuk PCR terutama di daerah endemisitas yang tinggi seperti Indonesia (20).

II.4 Antibiotik

Kata antibiotik diberikan pada produk metabolik yang dihasilkan suatu organisme tertentu, yang dalam jumlah amat kecil bersifat merusak atau menghambat mikroorganisme lain. Dengan kata lain antibiotik merupakan zat kimia yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang menghambat pertumbuhan atau mematikan mikroorganisme yang lain sedangkan toksisitasnya untuk manusia relatif kecil (21,22). Pencarian



antibiotik dimulai pada akhir tahun 1800-an ketika teori tentang asal-usul penyakit yang menyebutkan bahwa bakteri dan mikroorganisme lain sebagai penyebab penyakit diterima oleh masyarakat luas.

Suatu antibiotik yang ideal hendaknya memiliki sifat-sifat sebagai berikut :

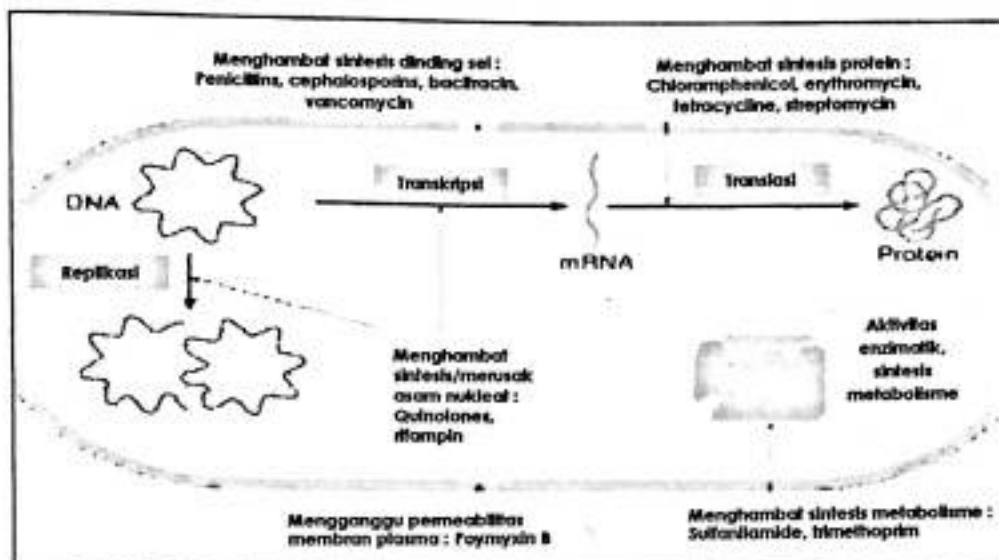
1. Mempunyai kemampuan untuk merusak atau menghambat mikroorganisme patogen spesifik.
2. Berspektrum luas.
3. Tidak mengakibatkan berkembangnya bentuk-bentuk resisten pada kuman.
4. Tidak melenyapkan flora normal pada inang.
5. Tidak menimbulkan efek samping yang tidak dikehendaki pada inang, seperti reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi pada ginjal atau saluran gastrointestinal.
6. Harus dapat diberikan melalui mulut tanpa dinaktifkan oleh asam lambung, atau melalui suntikan(parental) tanpa terjadi pengikatan dengan protein darah.
7. Memiliki taraf kelarutan yang tinggi dalam zat alir tubuh.
8. Konsentrasi antibiotik didalam jaringan atau darah harus dapat mencapai taraf cukup tinggi sehingga mampu menghambat atau mematikan penyebab infeksi (14,21).

II.4.1 Jenis Antibiotik

Meskipun ada lebih dari 100 macam antibiotik, namun umumnya mereka berasal dari beberapa jenis antibiotik saja, sehingga mudah untuk

dikelompokkan. Ada banyak cara untuk menggolongkan antibiotik, antara lain berdasarkan struktur kimianya, berdasarkan mekanisme kerja, berdasarkan manfaat dan sasaran kerja antibiotik dan berdasarkan daya kerja dikelompokkan sebagai berikut:

1. Berdasarkan struktur kimia, antibiotik dibedakan atas golongan Aminoglikosida, golongan Beta-Laktam, golongan Glikopeptida, golongan Poliketida, golongan Polimiksin, golongan Kinolon (fluorokinolon), golongan Streptogramin, golongan Oksazolidinon, golongan Sulfonamida, antibiotik lain yang penting, seperti kloramfenikol, klindamisin dan asam fusidat (23).
2. Berdasarkan mekanisme kerja terbagi atas: (1) Antibiotik yang mengganggu metabolisme sel mikroba, (2) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel mikroba, (3) Antibiotik yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, (4) Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel mikroba, (5) dan antibiotik yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat (7, 14, 24, 25).



Gambar 2. Mekanisme aktivitas antibiotik (Sumber. No.26 dapus (Sumber : Departement of Chemistry and Biochemistry. Antibiotics. Accessed 4 Februari 2005 Santa Edward's University.2005. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/antibiotics/1.GIV>)

3. Berdasarkan manfaat dan sasaran kerja, ada dua kelompok antibiotik yaitu (1) antibiotik yang memiliki spektrum kerja sempit misalnya antibiotik yang hanya aktif terhadap bakteri Gram positif saja dan tidak pada bakteri Gram negatif ataupun sebaliknya, (2) antibiotik yang memiliki spektrum luas yaitu antibiotik yang aktif terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (24,25).
4. Berdasarkan daya kerja atau sifat toksisitas selektifnya, ada antibiotik yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteristatik, dan ada antibiotik yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriosid (7,24).

II.5 Resistensi Antibiotik

Resistensi antibiotik merupakan suatu masalah yang besar yang berkembang diseluruh dunia. Kuman-kuman resisten yang muncul akibat

penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak rasional, akan menimbulkan masalah yang serius dan sulit diatasi. Saat ini kuman resisten terhadap antibiotik yang sudah banyak dikenal dan menimbulkan banyak masalah di seluruh dunia (5).

Resistensi sel mikroba adalah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba. Sifat ini dapat merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup. Dikenal tiga pola resistensi dan sensitivitas mikroba terhadap antimikroba. Pola I : belum pernah terjadi resistensi bermakna yang menimbulkan kesulitan diklinik. Pola II : pergeseran dari sifat peka menjadi kurang peka, tetapi tidak sampai terjadi resistensi sepenuhnya. Pola III sifat resistensi terhadap antibiotika (25).

II.5.1 Mekanisme Resistensi Mikroba Terhadap Antibiotik

Terdapat berbagai mekanisme yang menyebabkan mikroorganisme bersifat resisten terhadap antibiotika. Mekanisme tersebut antara lain adalah:

1. Mikroorganisme menghasilkan enzim yang menghancurkan obat aktif. Contohnya *Stafilokokus* yang resisten terhadap penisilin G menghasilkan β -Laktamase yang menghancurkan obat. β -Laktamase lain dihasilkan oleh bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif resisten terhadap aminoglikosida (disebabkan oleh plasmid) menghasilkan enzim asetilasi, fosforilasi, atau adenilisasi yang menghancurkan obat (7,14).
2. Mikroorganisme mengubah permeabilitasnya terhadap obat. Untuk mendapatkan efek terapi, antibiotik pertama kali harus mencapai

target kedalam sel kuman. Kuman Gram negatif mempunyai *outer membrane* yang sedikit menghambat antibiotik masuk ke dalam sitoplasma. Selanjutnya apabila terjadi mutasi dari lubang pori *outer membrane* berakibat antibiotik menjadi lebih sulit masuk ke dalam sitoplasma atau menurunnya permeabilitas membran terhadap antibiotik, oleh karena lubang pori dari *outer membrane* tersebut tidak bersifat selektif maka satu mutasi dari pori tersebut dapat menghambat masuknya lebih dari satu jenis antibiotika. Contoh: tetrasiklin menumpuk pada bakteri yang rentan tetapi tidak pada bakteri yang resisten (5,7).

3. Mikroorganisme menyebabkan perubahan target struktural untuk obat
Contoh: organisme resisten eritromisin mempunyai reseptor yang berubah pada sub unit 50S ribosom, disebabkan oleh metilasi RNA 23S ribosom. Resistensi terhadap beberapa penisilin dan sefalosporin mungkin diakibatkan oleh hilangnya atau berubahnya PBP. Resistensi penisilin pada *Streptococcus pneumoniae* dan enterokokus disebabkan oleh hilangnya PBP (7,14).

4. Mikroorganisme menyebabkan perubahan jalur metabolik yang melintasi reaksi yang dihambat oleh obat. Contoh: kuman yang sensitif terhadap sulfonamida, tidak memerlukan PABA dari luar sel, tetapi dapat menggunakan asam folat; sehingga sulfonamid yang berkompetisi dengan PABA tidak berpengaruh apa-apa pada metabolisme sel (7,14).

5. Mikroorganisme menyebabkan perubahan enzim yang masih dapat melakukan fungsi metaboliknya tetapi kurang dipengaruhi oleh obat.

Contoh: pada bakteri yang resisten terhadap trimetoprim, asam dihidrofolat reduktase dihambat kurang efisien daripada pada bakteri yang rentan terhadap trimetoprim (7).

II.5.2 Asal Resistensi Antibiotika

Pembahasan resistensi dibagi dalam kelompok resistensi genetik, resistensi non genetik dan resistensi silang.

1. Resistensi Genetik

Kebanyakan mikroba yang resisten obat timbul sebagai akibat perubahan genetik dan proses seleksi yang terjadi kemudian oleh obat antimikroba.

a. Mutasi spontan.

Dengan mutasi spontan gen mikroba berubah, sehingga mikroba yang sensitif terhadap suatu antimikroba menjadi resisten. Kejadian ini dinamakan mutasi spontan karena terjadi tanpa pengaruh ada atau tidaknya antimikroba tersebut. Dengan adanya antimikroba tersebut terjadi seleksi, galur yang telah resisten bermultiplikasi sedangkan galur yang sensitif terbasmi, sehingga terbentuknya populasi yang resisten.

b. Resistensi dipindahkan

Mikroba dapat berubah menjadi resisten akibat memperoleh suatu elemen pembawa faktor resisten. Faktor ini mungkin didapatkan dengan cara transformasi, transduksi, atau konjugasi. Dengan transformasi, mikroba menginkorporasi faktor resisten langsung dari media disekitarnya (lingkungannya). Pada transduksi, faktor resisten dipindahkan dari suatu

mikroba resisten ke mikroba sensitif dengan perantaraan bakteriofage. Dalam hal ini yang dipindahkan adalah suatu komponen DNA dari kromosom yang mengandung faktor resisten tersebut. Pada konjugasi akan terbentuk hubungan langsung antara isi sel kuman yang berkonjugasi sehingga memungkinkan perpindahan berbagai komponen antar kuman khususnya komponen pembawa faktor resisten. Plasmid merupakan suatu elemen genetik yang berada diluar kromosom dan dapat beriplikasi sendiri (DNA-plasmid) yang terpisah dari DNA-kromosom. Tidak setiap plasmid dapat dipindahkan. Yang dapat dipindahkan ialah plasmid faktor R. Faktor R terdiri atas dua unit: segmen RTF (*resistance transfer faktor*) dan determinan-r (unit-r). segmen RTF memungkinkan terjadinya perpindahan faktor R. masing-masing unit-r membawa sifat resistensi terhadap satu antimikroba.

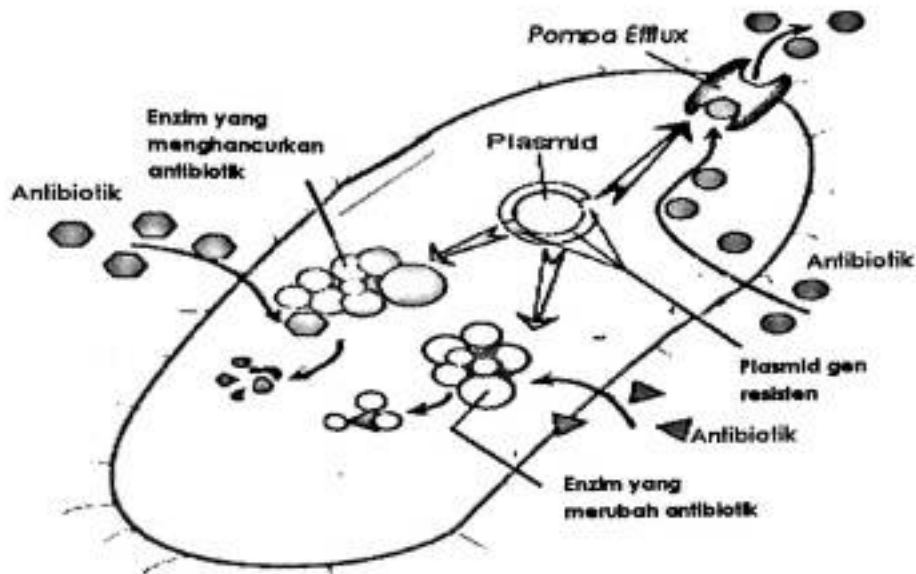
2. Resistensi Nongenetik

Bakteri dalam keadaan istirahat (inaktivitas metabolik) biasanya tidak dipengaruhi oleh antimikroba. Bila berubah menjadi aktif kembali, mikroba kembali bersifat sensitif, dan keturunannya juga tetap bersifat sensitif terhadap antimikroba.

3. Resistensi Silang

Resistensi silang ialah keadaan resistensi terhadap antimikroba tertentu yang juga memperlihatkan sifat resisten terhadap antimikroba yang lain. Pada resistensi silang biasanya terjadi antara antimikroba dengan struktur kimia yang hampir sama, atau antara antimikroba dengan

struktur kimia yang agak berbeda tetapi mekanisme kerjanya hampir sama (25).



Gambar 3. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotic (Sumber : Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*).

II.5.3 Pengujian Resistensi Antibiotik

1. Metode Konvensional.

Pengujian resistensi secara konvensional dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode utama : dilusi dan difusi, sesuai dengan standar *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram (*disc diffusion*) (7). Prosedur diagnostik konvensional tersebut membutuhkan waktu paling sedikit 1 minggu, selain itu kelemahan metode tersebut adalah sensitivitasnya yang rendah serta tidak mampu menguji resistensi sampai tingkat gen (9).

2. Metode Penentuan Resistensi Secara Molekuler

Pada saat ini penentuan resistensi dapat pula ditentukan dengan metode deteksi molekuler melalui PCR. Sejak penemuannya, teknik PCR telah merevolusi aspek dalam berbagai riset sains. Tidak hanya dibidang ilmu murni saja, akan tetapi teknik PCR tersebut telah menjadi bagian prosedural integral beerbagai bidang terapan seperti kedokteran, pertanian, forensik, dan bioremediasi. Di bidang kesehatan, PCR memberi andil besar dalam diagnosis berbagai penyakit termasuk demam tifoid, kelainan metabolik, penyakit bawaan (genetik), hingga deteksi keberadaan virus penyebab AIDS di sel manusia (27).

Dalam aspek terapuetik, teknik PCR telah dikembangkan sebagai metode penentuan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Peningkatan kasus resistensi multidrug pada demam tifoid telah mengilhami Haque et al (2005) untuk mengembangkan metode yang telah efektif dalam menentukan resistensi obat yang terjadi pada *Salmonella typhi*. Dalam penelitian tersebut Haque et al (2005) mengembangkan metode multiplex PCR untuk mendeteksi gen-gen penyebab resistensi *Salmonella typhi*. Multiplex PCR menggunakan modifikasi PCR yang dapat mengamplifikasi dua atau lebih urutan DNA target yang spesifik secara simultan dari suatu spesimen DNA template yang sama. Pada penelitian tersebut digunakan 4 (empat) primer untuk amplifikasi gen *gyrA* mutan, *sul2*, *Tem*, dan *CatP* yang masing-masing spesifik berperan dalam resistensi antibiotik ciprofloxacin, kloramfenikol, ampicillin, dan cotromoxazole (9).Keuntungan metode penentuan resistensi secara molekuler (PCR) adalah

membutuhkan waktu yang singkat dalam proses pelaksanaannya. Deteksi resistensi secara cepat tersebut dapat dengan cepat mengindikasikan apakah suatu antibiotik dapat digunakan untuk penanganan demam tifoid atau tidak. Dengan pemberian terapi antibiotik yang tepat, tingkat kematian dan kesakitan akibat demam tifoid dapat dikurangi.

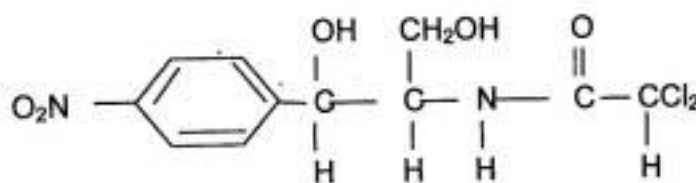
Selain membutuhkan waktu yang singkat, metode PCR dapat mendeteksi resistensi sampai ke tingkat gen. Teknik PCR memiliki sensitivitas 100% dalam mendeteksi gen-gen tertentu yang menjadi penyebab terjadinya resistensi antibiotik, hal tersebut disebabkan karena teknik PCR tersebut mampu mendeteksi gen yang diharapkan walau dari spesimen dengan jumlah yang amat kecil. Dalam hal spesifisitas PCR mampu mendeteksi 1 fragmen DNA (gen) spesifik secara cepat dan akurat dengan menggunakan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi fragmen DNA yang diinginkan (9,28).

II.6 Kloramfenikol .

Kloramfenikol pertama kali diisolasi pada tahun 1947 dari *Streptomyces venezuelae*. Agen ini disintesis pada tahun 1949, kemudian menjadi antibiotik penting pertama yang sepenuhnya disintesis dan diproduksi secara komersial (6). Karena mempunyai daya antimikroba yang kuat maka penggunaan obat ini meluas dengan cepat sampai pada tahun 1950 diketahui bahwa obat ini dapat menimbulkan anemia aplastik yang fatal (7). Kloramfenikol merupakan Kristal putih yang larut dalam alkohol dan sukar larut dalam air serta rasanya sangat pahit (25). Dewasa

ini kloramfenikol hanya dianjurkan pada beberapa jenis infeksi bila tidak ada kemungkinan lain, yaitu pada infeksi tifus (*S.typhi*) dan meningitis (khusus akibat *H. influenzae*), juga pada infeksi anaerob yang sukar dicapai obat, khususnya abses otak oleh *B. fragilis* (22).

Kloramfenikol kristalin adalah senyawa stabil yang secara cepat diabsorpsi dari saluran pencernaan dan tersebar secara luas ke dalam jaringan dan cairan tubuh, termasuk sistem syaraf pusat dan cairan serebrospinal, obat tersebut menembus sel dengan baik.. Ekskresi obat ini terutama melalui urin, 90% dalam bentuk tidak aktif.. Rumus molekul kloramfenikol ialah sebagai berikut:



Gambar 4. Struktur Kloramfenikol

Kloramfenikol adalah suatu inhibitor sintesis protein yang poten pada mikroorganisme. Obat tersebut menghambat perlekatan asam amino ke rantai peptida yang baru timbul pada sub unit 50S ribosom dengan mengganggu kerja enzim peptidil transferase. Kloramfenikol pada dasarnya bersifat bakteriostatik (7).

II.7 Plasmid Resistan terhadap Kloramfenikol dan Gen *catP*

Salmonella typhi yang resisten terhadap Kloramfenikol menghasilkan enzim *chloramphenicol acetyltransferase* (*cat*). Produksi enzim tersebut diatur oleh suatu plasmid yang mengandung gen *catP*

yaitu gen yang mengkode sintesis enzim chloramphenicol acetyltransferase suatu enzim intraseluler yang mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan asetoksikloramfenikol sehingga kloramfenikol yang telah melewati membran plasma dan memasuki sel menjadi nonaktif (6,7,8,24). Gen ini terdapat pada urutan basa 3601 sampai 4021, dengan jumlah 436 pasangan basa. Adapun urutan dari gen *catP* dapat dilihat pada gambar (29).

```

3601 gaagctaaaa  tggagaaaa  aatcactgga  tataccaccg  tgatatac  ccaatggcat
3661 cgtaaagaac  atttgaggc  atttcagtca  gttgctca  gtacctataa  ccagaccgtt
3721 cagctggata  ttacggcctt  tttaaagacc  gtaaagaaaa  ataagcacia  gttttatccg
3781 gcctttatc  acattctgc  ccgctgatg  aatgctcctc  cggaattccg  tatggcaatg
3841 aaagacgggtg  agctgggtgat  atgggatagt  gttcacctt  gttacaccgt  tttccatgag
3901 caaactgaaa  cgtttctac  gctctggagt  gaataccacg  acgatttccg  gcagtttcta
3961 cacatatatt  cgcaagatgt  ggcgtgttac  ggtgaaaacc  tggcctatct  ccctaaaggg
4021 tttattgaga  atatgtttt  cgtctcagcc  aatccctggg  tgagttcac  cagttttgat
4081 ttaaactgtg  ccaatatgga  caactcttc  gcccccgttt  tcaccatggg  caaatattat
4141 acgcaaggcg  acaaggtgct  gatgccgctg  gcgattcagg  ttcacagggc  cgtctgtgat
4201 ggcttccatg  tcggcagaat  gcttaatgaa  ttacaacagt  actgcgatga  gtggcagggc
4261 ggggcgtaat  tttttaagg  cagtattgg  tgccttaaa  cgcctggtgc  tacgcctgaa

```

Gambar 5 : Urutan gen *catP* dengan Accession Number : U46780. (Sumber : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)

Deteksi berdasarkan gen *catP* telah dilaporkan dengan persentase resistensi kloramfenikol sebanyak 73.9% dari 23 *S.typhi* (9).

Penelitian mengenai analisis molekuler dan deteksi gen resisten terhadap kloramfenikol pada plasmid telah dilakukan oleh beberapa ahli antara lain; Shanahan et al., 1998; Sherburne et al., 2000; Mirza et al., 2000 dan Wain et al., 2004. Semuanya menyimpulkan adanya resistensi terhadap kloramfenikol.

II.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti dari perusahaan *CETUS Corporation*. Metode ini telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA (28).

Kemajuan dibidang biologi molekuler telah memungkinkan untuk dilakukan penelitian untuk mendeteksi DNA *S.typhi* dalam darah dengan teknik hibridisasi DNA dan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Nested PCR* (*nPCR*) dapat mendeteksi DNA *S.typhi* dalam jumlah mikroba yang sangat sedikit (10 mikroba atau 40 fg DNA).

Secara ringkas prinsip PCR dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Pada suhu $92-95^{\circ}\text{C}$, DNA mengalami denaturasi (pembelahan untai ganda menjadi untai tunggal)
2. Jika suhu diturunkan sampai $36-72^{\circ}\text{C}$ maka primer akan menempel pada DNA yang terbelah pada tempat yang spesifik (annealing)
3. Apabila suhu dinaikkan lagi sampai 72°C , maka primer dengan bantuan DNA polymerase akan membentuk untai DNA sesuai dengan urutan DNA yang telah terbelah atau terdenaturasi (polymerization/elongation) (27).

Hasil PCR dapat dilihat dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose. Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah pada pengantar listrik (buffer), molekul DNA yang bermuatan negatif akan bergerak menuju ke muatan positif. Molekul DNA yang berukuran kecil bergerak lebih cepat daripada yang berukuran besar. Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*). DNA di dalam gel agarose diwarnai dengan menggunakan ethidium bromide (EtBr) yaitu zat warna yang dapat berflourosensi dibawah sinar ultraviolet. Ethidium bromida dapat menyisip di antara basa-basa DNA serta membuat rantai DNA menjadi kaku. DNA hasil amplifikasi tampak sebagai pita yang jelas dan terang apabila ditempatkan diatas sinar UV menggunakan alat gel doc (27,30).

II.8.1 Jenis-Jenis PCR

Beberapa jenis dan kegunaannya dikenal beberapa macam PCR.

1. Multiplex PCR adalah jenis PCR yang menggunakan beberapa pasang primer yang spesifik untuk target yang berbeda pada suatu amplifikasi DNA yang sama.
2. Quantitative Comparative-PCR (QC-PCR), menggunakan tambahan eksogen internal. Tambahan tersebut terdiri dari fragmen DNA yang kedua sisinya terdapat urutan DNA target dan urutan DNA spesifik.
3. Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR), merupakan jenis PCR yang dapat mendeteksi mutasi yang terdapat pada genom DNA. RFLP-PCR ini mampu mengamplifikasi DNA termasuk urutan yang termutasi dengan menggunakan apitan primer diikuti enzim restriksi.
4. Nested PCR, adalah jenis PCR yang menggunakan dua amplifikasi secara terpisah dengan dua set primer. Set primer pertama digunakan untuk mengamplifikasi untai DNA target dan pada amplifikasi produk amplifikasi pertama.
5. Deteksi point mutation
The Amplification Refractory Mutation System (ARMS) menggunakan primer dengan 3' yang mismatch dan polymerase yang telah kehilangan aktivitas eksonukleasenya (3' ke 5'). Jika terjadi mismatch, maka reaksi PCR akan berjalan (31).

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Analisis deskriptif* yaitu mendeteksi adanya resistensi terhadap antibiotik Kloramfenikol pada *Salmonella typhi* isolat Jayapura dengan mendeteksi gen menggunakan teknik molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

III.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu dan tempat penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2009 di RS AL, RSUD Jayapura, Labkesda Jayapura dan Laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

III.3 Populasi dan Sampel Penelitian

III.3.1 Populasi Penelitian

Penderita suspek demam tifoid dari beberapa Rumah Sakit dan Laboratorium Kesehatan Daerah di Jayapura-Papua.

III.3.2 Sampel Penelitian

Sampel berupa darah sebanyak 67 sampel yang diambil dari penderita suspek demam tifoid dari wilayah Jayapura-Papua.

III.3.3 Kriteria Sampel

Kriteria sampel adalah :

1. Telah menjalani pemeriksaan fisik dan dinyatakan sebagai suspek demam tifoid.
2. Penderita suspek demam tifoid yang belum mendapat terapi antibiotik.

III.4 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *micro pipet* (*single channel* 5-25 μ l, 25-50 μ l, 50-100 μ l; *multi channel* 25-50 μ l, 50-150 μ l) (Bio-Rad), *micro shaker*, autoklaf, incubator, (Memmert), tabung *eppendorf*, *vortex shaker*, rak tabung *eppendorf*, sentrifuge, neraca analitik, gelas ukur, botol reagen, , *refrigerator*, *freezer*, *water bath*, atau *dry block heater*, *biohazard (safety cabinet)*, *thermocycler*, elektroforesis, perangkat ultraviolet (UV), dan kamera digital.

III.5 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah penderita yang terinfeksi *Salmonella typhi*, *Bactec*, medium *Salmonella Shigella Agar* (SSA), medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), medium *Sulfit Indol Motility* (SIM), medium *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), medium uji urea, medium uji sitrat (medium Simon Citrate Agar), dan medium uji gula-gula, , larutan standart NaCl fisiologis steril, larutan hipoklorit 2%, , HCl, *high purity analytical grade celite* (diatoms) (Jansen

chimica, Beerse, Belgium 10. 846.79), *pure distilled water* , GuSCN (*Guanidium thiocyanate*) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, catalog No. 50990), Tris HCl, EDTA, NaOH, Triton X-100 (Roche, 789704), etanol 705, acetone, MgCl₂, Gelatin, dNTP, Taq DNA polymerase, agarose, aquadest steril, etidium bromide , *Loading buffer*.

III.6 Prosedur Kerja

III.6.1 Uji Widal

Dibuat seri slide O dan H pada mikroplate. Isi serum pada seri slide O dan H secara berturut-turut : 80 µl, 40 µl, 20 µl, 10 µl , 5 µl. Sebagai kontrol adalah slide ke 6 diisi dengan satu tetes kontrol positif, sehingga didapatkan pengenceran : 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Masing-masing slide O dan H ditambahkan dengan satu tetes antigen, termasuk kontrol. Serum dan antigen dicampur dengan menggunakan stik bersih pada masing-masing slide, selanjutnya mikroplate dishaker selama 2 menit. Adanya aglutinasi pada masing-masing slide diamati, dengan syarat kontrol harus terjadi aglutinasi.

III.6.2. Uji Kultur Darah

Sampel darah dimasukkan ke dalam medium *Bactec plus aerobic/F* kemudian dikirim ke laboratorium Immunologi dan Biologi molekuler Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pengiriman dilakukan dalam temperatur kamar. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 35-37°C selama 24 jam. Koloni

chimica, Beerse, Belgium 10. 846.79), *pure distilled water* , GuSCN (*Guanidium thiocyanate*) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, catalog No. 50990), Tris HCl, EDTA, NaOH, Triton X-100 (Roche, 789704), etanol 705, acetone, MgCl₂, Gelatin, dNTP, Taq DNA polymerase, agarose, aquadest steril, etidium bromide , *Loading buffer*.

III.6 Prosedur Kerja

III.6.1 Uji Widal

Dibuat seri slide O dan H pada mikroplate. Isi serum pada seri slide O dan H secara berturut-turut : 80 µl, 40 µl, 20 µl, 10 µl , 5 µl. Sebagai kontrol adalah slide ke 6 diisi dengan satu tetes kontrol positif, sehingga didapatkan pengenceran : 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Masing-masing slide O dan H ditambahkan dengan satu tetes antigen, termasuk kontrol. Serum dan antigen dicampur dengan menggunakan stik bersih pada masing-masing slide, selanjutnya mikroplate dishaker selama 2 menit. Adanya aglutinasi pada masing-masing slide diamati, dengan syarat kontrol harus terjadi aglutinasi.

III.6.2. Uji Kultur Darah

Sampel darah dimasukkan ke dalam medium *Bactec plus aerobic/F* kemudian dikirim ke laboratorium Immunologi dan Biologi molekuler Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pengiriman dilakukan dalam temperatur kamar. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 35-37^oC selama 24 jam. Koloni

yang tumbuh diinokulasikan ke medium *Salmonella Shigella* agar (SS) pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diamati pertumbuhannya. Koloni tunggal *Salmonella typhi* dengan bentuk koloni bulat (*circular*), tepi rata (*entire*), permukaan koloni cembung (*convex*) dengan warna koloni tampak bening dan bagian tengahnya hitam pada medium SS, kemudian diuji secara biokimia yaitu pengujian pada medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfit Indol Motility* (SIM), *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), uji urease, konsumsi sitrat dan uji fermentasi gula-gula.

III.6.3 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

III.6.3.1 Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dengan metode Boom (32).

Sebanyak 100 µl sampel darah dicampur dengan 900 µl buffer lisis L6 (50 mM Tris-HCl, 5,25 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0,2% Triton X-100) divortex lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik, selanjutnya 40 µl suspensi diatom (*celite suspension*) ditambahkan. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian di *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit.

Diatom yang telah mengandung DNA terikat kemudian diendapkan melalui sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan endapan (*pellet*) diatom dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2 (*washing buffer*) yang terdiri dari campuran 5,25 M GuSCN dalam 0,1 M Tris-HCl, pH 6,4. Setelah itu dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak dua kali dan terakhir dicuci dengan aseton sebanyak 1 kali. Setelah itu,

dikeringkan dengan cara diinkubasikan dalam oven dengan suhu 56°C selama 10 menit. Pellet yang sudah dikeringkan tersebut kemudian dicampurkan dengan 80 µl aquadest steril dan diinkubasikan pada suhu 56°C selama 10 menit. Selanjutnya, diatom diendapkan melalui sentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 detik, kemudian supernatannya diambil. Pada akhir dari prosedur metode Boom akan didapatkan sejumlah 40-50 µl DNA yang tersuspensi dalam aquadest steril. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu 20°C atau suhu -80°C.

III.6.3.2 Deteksi DNA *Salmonella typhi* (Gen *Flagellin*) dengan *Nested PCR*

Setelah diperoleh DNA hasil ekstraksi, disiapkan campuran reaksi PCR sebanyak 68X dan setiap campuran reaksi 1X terdiri dari : 28,5 µl dH₂O, 5 µl buffer PCR 10X, 2 µl dNTPs, Primer ST1 dan ST2 masing-masing 1 µl dan 0,5 µl Taq Polimerase. Campuran reaksi ini dimasukkan kedalam tabung 0,5 ml dan ditambahkan 2,5 µl ekstrak DNA hasil ekstraksi.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94°C kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit 15 detik, annealing pada suhu 57°C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu pada suhu 16°C.

Sebanyak 5 µl produk amplifikasi pertama kemudian ditambahkan dengan campuran reaksi PCR kedua. Campuran reaksi kedua ini hampir sama dengan campuran reaksi PCR pertama, hanya saja primer untuk amplifikasi kedua ini adalah ST3 dan ST4.

Amplifikasi kedua dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94°C kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 68°C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu 16°C.

III.6.3.3 Deteksi Gen *catP* *Salmonella typhi* dengan PCR

Bahan-bahan yang siap diPCR dimasukkan kedalam tabung PCR. Setiap tabung PCR *mix* berisi 2,5 µl dengan komposisi 2,5 µl 10x buffer (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin), 1 µl primer *catP forward* : (5'-TCCCAATGGCATCGTAAAGAAC-3'), 1 µl primer *catP reverse* : (5'-TCGTGGTATTCACTCCAGAGCG-3'), 0,5 µl *Taq* DNA polymerase, 2,5 µl dNTP, aquades 15 µl dan 2,5 µl DNA sampel.

Amplifikasi pada mesin PCR (*thermocycler*) dilakukan sebanyak 30 siklus, dimana satu siklus terdiri dari denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, annealing selama 1 menit pada suhu 55°C dan extension selama 1 menit pada suhu 72°C.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Dari proses pengumpulan sampel diperoleh enam puluh tujuh (67) isolat *Salmonella typhi* dari Jayapura. Keenam puluh tujuh isolat (darah) tersebut kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan melakukan deteksi DNA *S.typhi* (gen *Flagellin*).

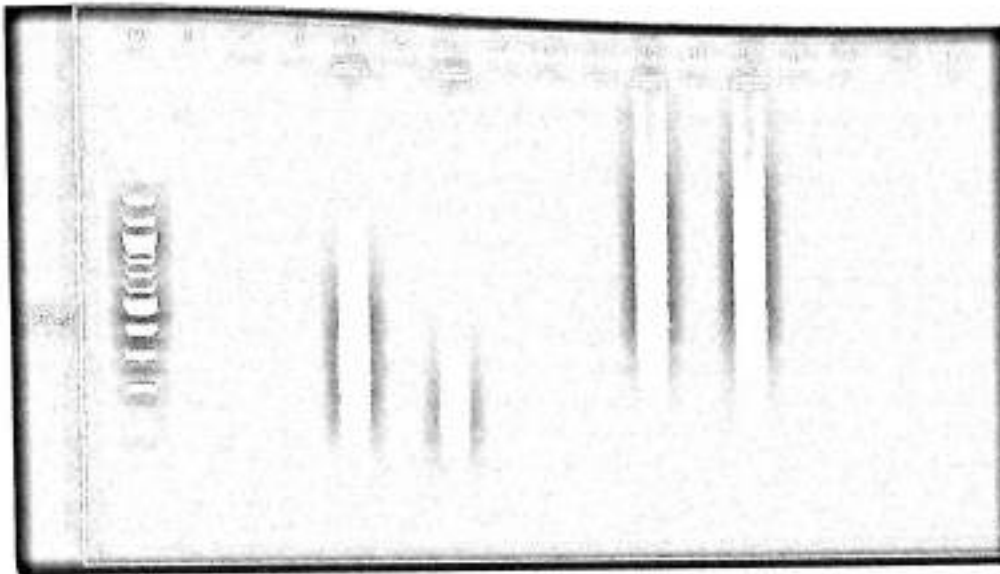
Tabel 1 : Hasil Uji Kultur, Nested PCR dan Gen *catP* dari *Salmonella typhi*

Kultur		PCR Nested		Gen <i>catP</i>	
Positif	Negatif	Positif	Negatif	Resisten	Sensitif
1 (1,5 %)	66 (98,5 %)	25 (37,3 %)	42 (62,7 %)	6 (24 %)	19 (76 %)

Berdasarkan data pada Tabel 1, jumlah penderita demam tifoid yang *S.typhi* positif berdasarkan uji kultur hanya 1 (1,5%) dan negatif 66 (98,5%). Berdasarkan hasil PCR terdapat *S.typhi* positif sebanyak 25 (37,3%) dan negatif 42 (62,7%). Berdasarkan hasil amplifikasi gen *catP* yang resisten terhadap kloramfenikol dengan uji PCR terdapat sebanyak 6 (24%) dan sensitif sebanyak 19 (76%) dari 25 sampel yang positif *S.typhi* berdasarkan uji dengan teknik PCR..

Adapun gambar produk amplifikasi gen *catP* dengan teknik PCR dapat dilihat pada gambar a dan b. Sampel dikatakan positif

mengamplifikasi gen *catP* jika terdapat pita DNA dengan fragmen 436 pasangan basa.



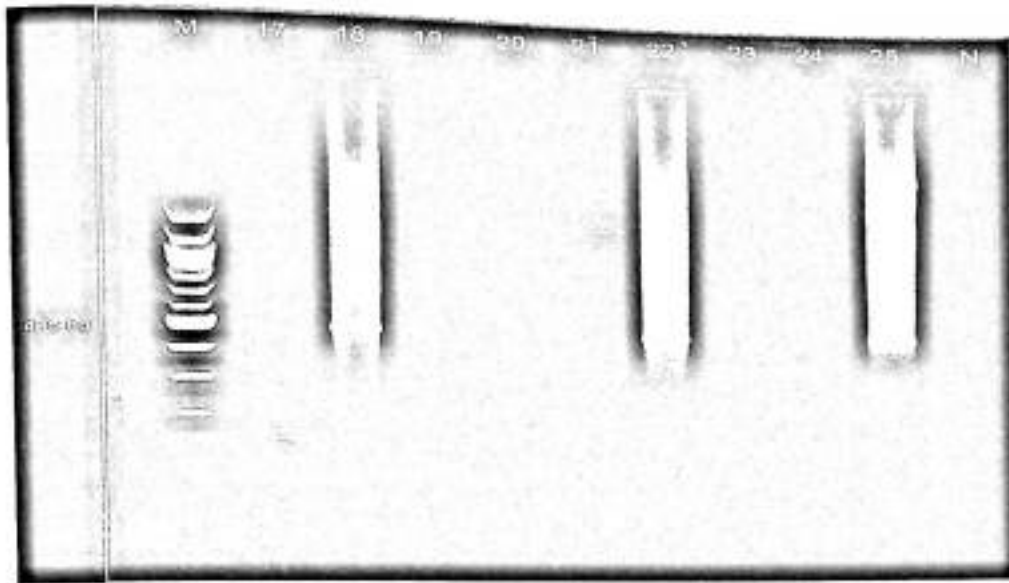
Gambar a. Hasil Elektroforesis produk PCR deteksi gen *catP* 436 bp pada sampel 1-16

Keterangan :

Sumur 1 (M) :Marker
 Sumur 2(1) :Hasil PCR sampel 1
 Sumur 3(2) :Hasil PCR sampel 2
 Sumur 4(3) :Hasil PCR sampel 3
 Sumur 5(4) :Hasil PCR sampel 4
 Sumur 6(5) :Hasil PCR sampel 5
 Sumur 7(6) :Hasil PCR sampel 6
 Sumur 8(7) :Hasil PCR sampel 7
 Sumur 9(8) :Hasil PCR sampel 8

Sumur 10(9) :Hasil PCR sampel 9
 Sumur 11(10):Hasil PCR sampel 10
 Sumur 12(11):Hasil PCR sampel 11
 Sumur 13(12):Hasil PCR sampel 12
 Sumur 14(13) Hasil PCR sampel 13
 Sumur 15(14):Hasil PCR sampel 14
 Sumur 16(15):Hasil PCR sampel 15
 Sumur 17(16):Hasil PCR sampel 16

Gambar a menunjukkan hasil pada elektroforesis produk PCR yang dibaca dengan alat gel Doc (dibawah sinar UV). Pada sampel 4, 10, 12 dapat dilihat tampak pita DNA pada posisi 436 bp (marker), artinya sampel tersebut positif mengamplifikasi gen *catP* Sedangkan pada sampel 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16 tidak tampak pita DNA dan sama dengan kontrol negatif (N).



Gambar b. Hasil Elektroforesis produk PCR deteksi gen *catP* 436 bp pada sampel 17-25
 Sumur 1 (M) :Marker
 Sumur 2(17) :Hasil PCR sampel 17
 Sumur 3(18) :Hasil PCR sampel 18
 Sumur 4(19) :Hasil PCR sampel 19
 Sumur 5(20) :Hasil PCR sampel 20
 Sumur 6(21) :Hasil PCR sampel 21
 Sumur 7(22) :Hasil PCR sampel 22
 Sumur 8(23) :Hasil PCR sampel 23
 Sumur 9(24) :Hasil PCR sampel 24
 Sumur 10(25):Hasil PCR sampel 25
 Sumur 11(N) :Kontrol Negatif

Gambar b menunjukkan hasil Elektroforesis gel produk PCR dibaca dengan menggunakan alat gel Doc (dibawah sinar UV) menunjukkan bahwa sampel tersebut positif mengamplifikasi gen *catP*. Pada sampel 18, 22, 25 tampak pita DNA pada posisi 436 bp (marker). Pada sampel 17, 19, 20, 21, 23, 24 tidak tampak pita DNA dan sama dengan kontrol negatif, artinya sampel tersebut tidak mengamplifikasi gen *catP*.

IV.2 Pembahasan

Dari hasil yang diperoleh, jumlah penderita demam tifoid berdasarkan hasil uji PCR positif adalah sebanyak 25(37,3 %) sampel dan berdasarkan hasil kultur sebanyak 1(1,5%) sampel. Menurut Kadang (2003), demam

tifoid dapat ditemukan pada semua umur. Sebagaimana diketahui, setelah *S.typhi* masuk kedalam tubuh melalui makanan atau minuman yang tercemar, kemudian masuk ke dalam lambung, ke kelenjar limfoid usus kecil, bakteri tersebut masuk ke peredaran darah. Ini berlangsung singkat $\pm 24-72$ jam atau pada minggu pertama tetapi bakteri telah mencapai organ hati, kantung empedu, limpa, sum-sum tulang dan ginjal. Pada akhir masa inkubasi yaitu 7-14 hari, bakteri *S.typhi* kembali ke peredaran darah. Kultur darah yang paling baik adalah selama minggu pertama sakit, sampai minggu kedua dan sebelum pemberian antibiotika dapat memberikan hasil positif, karena bakteri telah memperbanyak diri di beberapa jaringan tersebut sebelum masuk ke peredaran darah. Telah diketahui bahwa berbagai faktor yang dapat mempengaruhi hasil kultur, diantaranya jumlah bakteri yang beredar dalam darah sangat rendah, komposisi serum yang dapat menghambat dan membunuh bakteri, zat makanan, pH, temperatur, aerasi, konsentrasi garam, dan kekuatan ionik pada medium.

Pada uji PCR, resistensi kloramfenikol dideteksi dengan mengamplifikasi gen *catP*. Gen *catP* adalah gen yang bertanggung jawab terhadap adanya resistensi kloramfenikol. Gen ini menyandi sintesis enzim *Chloramphenicol acetyltransferase*, suatu enzim intraseluler yang mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan asetoksik kloramfenikol sehingga kloramfenikol yang telah melawati membran plasma dan telah memasuki sel menjadi inaktif (9,24). Gen ini terdapat

pada urutan basa 3601 sampai 4021, dengan jumlah 436 pasangan basa (gambar a dan b).

Hasil penelitian menunjukkan adanya resistensi terhadap kloramfenikol. Terdapat 6 (24%) sampel yang dinyatakan resisten dari 25 sampel yang positif *S.typhi* dengan uji PCR. Resistensi antibiotika muncul akibat penggunaan antibiotika yang tidak terkontrol dan tidak rasional, sehingga untuk terapi antibiotika pada *S.typhi* yang telah resisten terhadap kloramfenikol dapat diganti dengan pemilihan jenis antibiotik yang baru yang lebih efektif juga dengan penggunaan kombinasi dua atau lebih obat untuk mendapatkan hasil terapi yang diharapkan dan mencegah berkembangnya *S.typhi* yang resisten lebih luas.

Dengan demikian PCR dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi terhadap kloramfenikol. Keuntungannya adalah dengan PCR kita dapat mengetahui adanya *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol karena adanya gen *catP* meskipun dengan jumlah sampel atau bakteri yang sedikit (10 bakteril/ml). keberadaan gen *catP* ini penting untuk diketahui karena gen ini dapat saja dipindahkan atau ditularkan ke *S.typhi* lain sehingga memunculkan *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol (*transferred resistance*). Disamping itu waktu yang dibutuhkan untuk mengetahui adanya *S.typhi* yang resisten atau sensitif dengan menggunakan teknik PCR sangat singkat (± 1 hari) dibanding dengan teknik konvensional (*disc diffusion* ± 1 minggu).

pada urutan basa 3601 sampai 4021, dengan jumlah 436 pasangan basa (gambar a dan b).

Hasil penelitian menunjukkan adanya resistensi terhadap kloramfenikol. Terdapat 6 (24%) sampel yang dinyatakan resisten dari 25 sampel yang positif *S.typhi* dengan uji PCR. Resistensi antibiotika muncul akibat penggunaan antibiotika yang tidak terkontrol dan tidak rasional, sehingga untuk terapi antibiotika pada *S.typhi* yang telah resisten terhadap kloramfenikol dapat diganti dengan pemilihan jenis antibiotik yang baru yang lebih efektif juga dengan penggunaan kombinasi dua atau lebih obat untuk mendapatkan hasil terapi yang diharapkan dan mencegah berkembangnya *S.typhi* yang resisten lebih luas.

Dengan demikian PCR dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi terhadap kloramfenikol. Keuntungannya adalah dengan PCR kita dapat mengetahui adanya *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol karena adanya gen *catP* meskipun dengan jumlah sampel atau bakteri yang sedikit (10 bakteril/ml). keberadaan gen *catP* ini penting untuk diketahui karena gen ini dapat saja dipindahkan atau ditularkan ke *S.typhi* lain sehingga memunculkan *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol (*transferred resistance*). Disamping itu waktu yang dibutuhkan untuk mengetahui adanya *S.typhi* yang resisten atau sensitif dengan menggunakan teknik PCR sangat singkat (± 1 hari) dibanding dengan teknik konvensional (*disc diffusion* ± 1 minggu).

BAB V PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa :

Ditemukan 6 (24%) dari 25 sampel, resisten terhadap kloramfenikol berdasarkan amplifikasi gen *catP* dengan teknik PCR, dan 19 (76%) yang masih sensitif terhadap kloramfenikol pada *Salmonella typhi* isolat Jayapura.

V.2 Saran

1. Disarankan penggunaan teknik PCR dalam uji resistensi dengan pertimbangan waktu uji yang singkat dengan kepekaan yang tinggi sehingga tindakan pengobatan pada penderita demam tifoid cepat dilakukan
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai gen *catP* apakah juga berhubungan dengan resistensi beberapa antibiotik yang biasa digunakan dalam pengobatan demam tifoid.

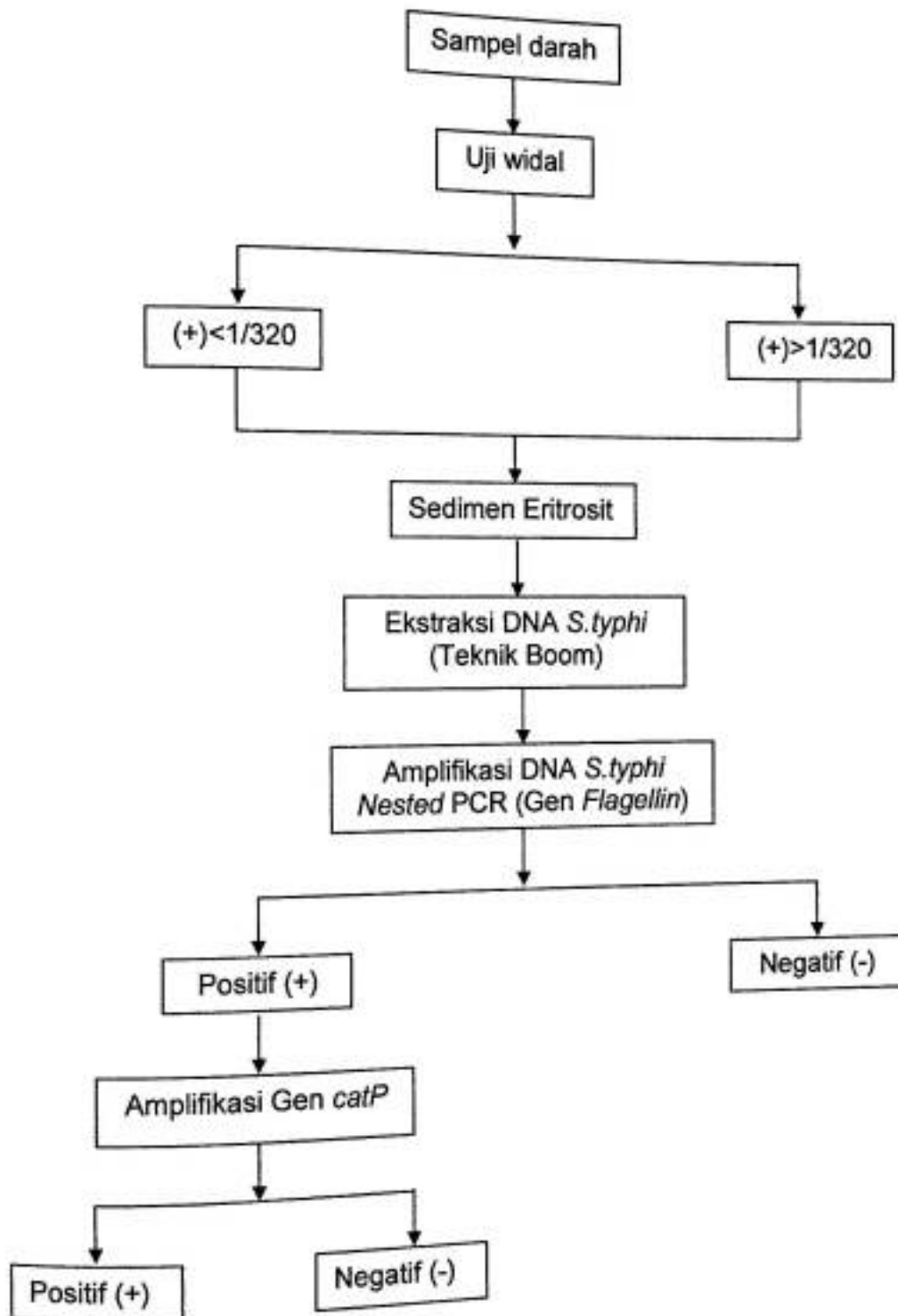
DAFTAR PUSTAKA

1. Sacher RA dan McPherson RA, *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Ed.11. EGC. Jakarta. 2004. hal. 414,567
2. Senthilkumar B dan Prabakaran G. *Multidrug Resistant salmonella typhi in Asymptomatic Typhoid Carriers among Food Handler in Namakkal District, Tamil Nadu*. Indian Journal of Medical Microbiology. Special Article. 23 (2).2005. hal. 92-94
3. Mirza,S.,Kariuki S., Mamun KZ., Beeching NJ dan Hart. *Analysis of Plasmid and Chromosomal DNA of Multidrug Resistant Salmonella enteric Serovar Typhi from Asia*. Journal of clinical Microbiology. 2000.Vol.38.no.4. hal.1449-1452
4. Soegijanto,S. *Ilmu Penyakit Anak Diagnosa dan Penatalaksanaan*. Jakarta. Salemba Medika. 2002. hal. 32
5. Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M.K., dan Setiati, S.,*Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Ed. IV. Jakarta. Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam FKUI. 2007.hal. 1752-1753
6. Katzung, B. G., *Farmakologi Dasar Dan Klinik*. Ed.8. Penerjemah :Bagian Farmakologi FK Universitas Airlangga. Jakarta. Salemba Medika. 2004. hal. 38
7. Jawetz, E., Melnick.J.L., dan Adelberg,E.A., *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed.23. terjemahan oleh Hartanto H, Rahman C, Dimanti A, Karolina S dan Indriyani F. Jakarta. EGC. 2008. hal. 166,170
8. Haque,A., catP gene. Sequencing of catP gene. *Personal Communication.*, 2006
9. Haque A, Sawar Y, Aamir A, Saira B, Ayesha T, dan Mushkoor M . *Identifikasi Of Drug Resistance Genes In Clinical Isolate Of Salmonella typhi For Development Of Diagnostic Multiplex PCR*. Pak J. Med. Sci. 2005; Vol.21 No.4, hal. 402-407
10. Hatta,M., *Pendekatan Biologi Molekuler Dan Immunologi DiBidang Penyakit Infeksi Dalam Era Globalisasi Dan Peluang Bagi Ilmuwan Indonesia.*, Suplement. Vol.26 no. 3., 2005

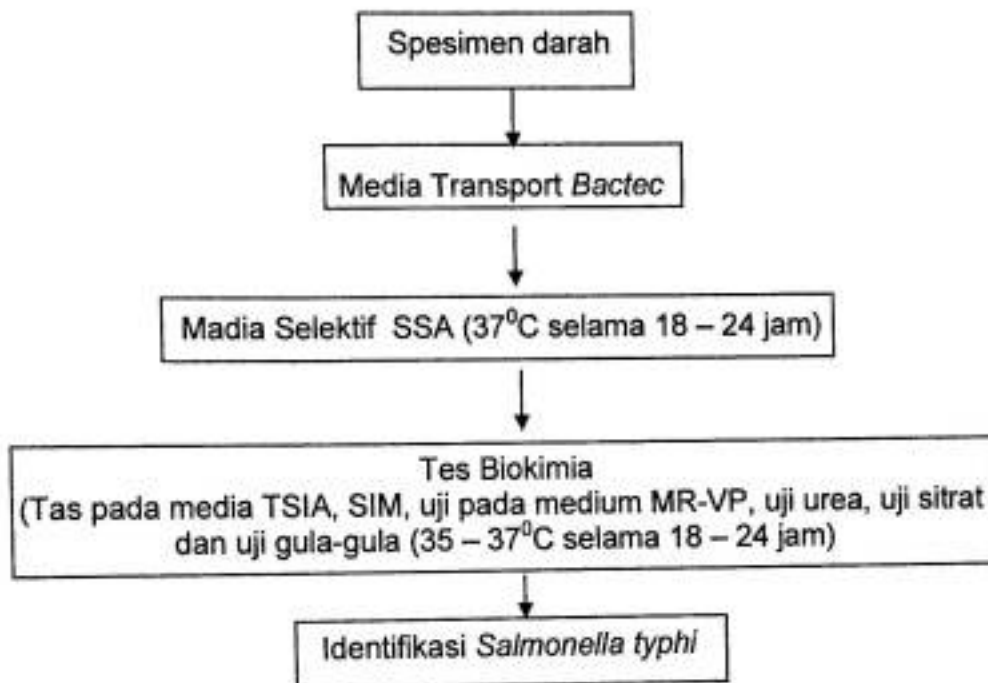
11. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan *Laporan Riskesdas Nasional 2007*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008. hal.107. available from: <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Nasional/laporanNasional.pdf> : diakses tgl 03 april 2009
12. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan *Laporan Riskesdas Provinsi Papua 2008*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008. hal.81. Available from <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Papua/laporanPapua.pdf> : diakses tgl 03 April 2009
13. Hardjono, Tenri Esa, Nurhayana. *Kumpulan Penyakit Infeksi dan Tes Kultur Sensitivitas Kuman serta Upaya Pengendaliannya*. Cahya Dinar Rucitra. Makassar. 2007. hal.151.
14. Staf Pengajar Fak. Kedokteran UI. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Ed.Revisi. Bina Rupa Aksara. 1994. hal. 169-173
15. Mr.Arsooth. *Genus Salmonella*. [dikutip 30 Juni 2009]. Available from:www.vphcap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf
16. Bergye; David Hendrick, 1974. *Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology*. Edisi VIII; waverly/incnh. royal and Guilford aveys balvimore, USA. hal.9
17. Gupte S. *Mikrobiologi Dasar*. Bina Rupa Aksara. Jakarta. 1990. hal 272-278.
18. Anonim. Prevention Specific infection Disease. Thypoid Fever in CDC Health Information Travel. [dikutip 24 Januari 2009]. Available from: <http://www.cdc.gov/>
19. World Health Organization. *The Diagnosis, treatment and Prevention Of Typhoid Fever*. 2003. Hal. 1-18
20. Informasi Laboratorium. *Pemeriksaan Anti Salmonella typhi IgM Untuk Diagnosis Demam Tifoid*. Prodia No 5. 2006 hal. 1-3
21. Pelczar MJ, Chan ECS. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 2008. hal. 70
22. Tan HT, Rahardja K. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. Ed.VI. PT Elex Media Komputindo: Jakarta. 2002. hal. 85

23. Surini S. Antibiotik, Si "Peluru Ajaib". 2006. accessed 03 April 2009 .Available from: <http://www.beritaipetek.com>.
24. Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 2008. hal. 167,170.
25. Bagian Farmakologi. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi FK UI. Jakarta 2003. Hal. 571 - 574
26. Departement of Chemistry and Biochemistry. Antibiotics. Accessed 4 Februari 2005 Santa Edward's University. 2005. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/antibiotics/Gift>
27. Muladno. *Dasar-dasar Teknik DNA Dan Beberapa Aplikasinya*. Balai Penelitian dan Pengembangan Zoologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI. Bogor: 2001
27. Yuwono T. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 2006. hal.1-2.
28. GenBank NCBI. accessed 4 Februari 2009. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2_PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)
30. Old RW, Primrose SB. *Prinsip – Prinsip Manipulasi Gen*. Universitas Indonesia-Press. Jakarta 2003. hal.5
31. Putra ST. *Biologi Molekuler Kedokteran*. Airlangga University Press. Surabaya 1999. hal.157 - 158
32. Hatta M, Smith HL. *Detection of Salmonella typhi by Nested Polymerase Chain Reaction In Blood, Urine and Stools Samples* American Society Of Tropical Medicine and Hygiene. 2007. 76 (1). hal. 139 - 143
33. Kadang KJ. *Pengenalan Dini Demam Tifoid*. Makalah Temu Muka Dan Konsultasi Metode Tepat Mengatasi Demam Untuk Pengenalan Dini Demam Berdarah Dan Tifoid. Klinik Anakku. Bekasi: 2000

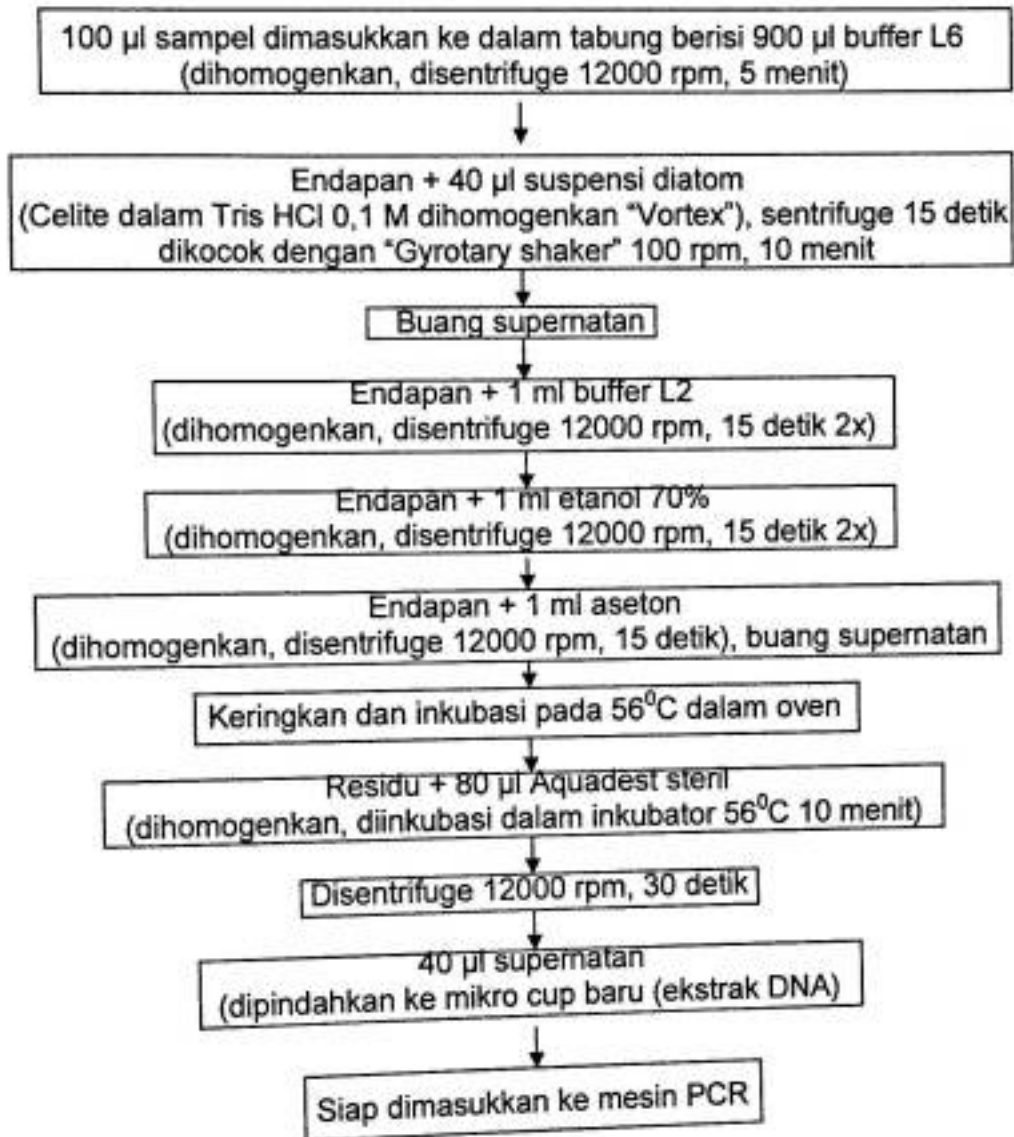
Lampiran 1 :
Skema Alur Penelitian



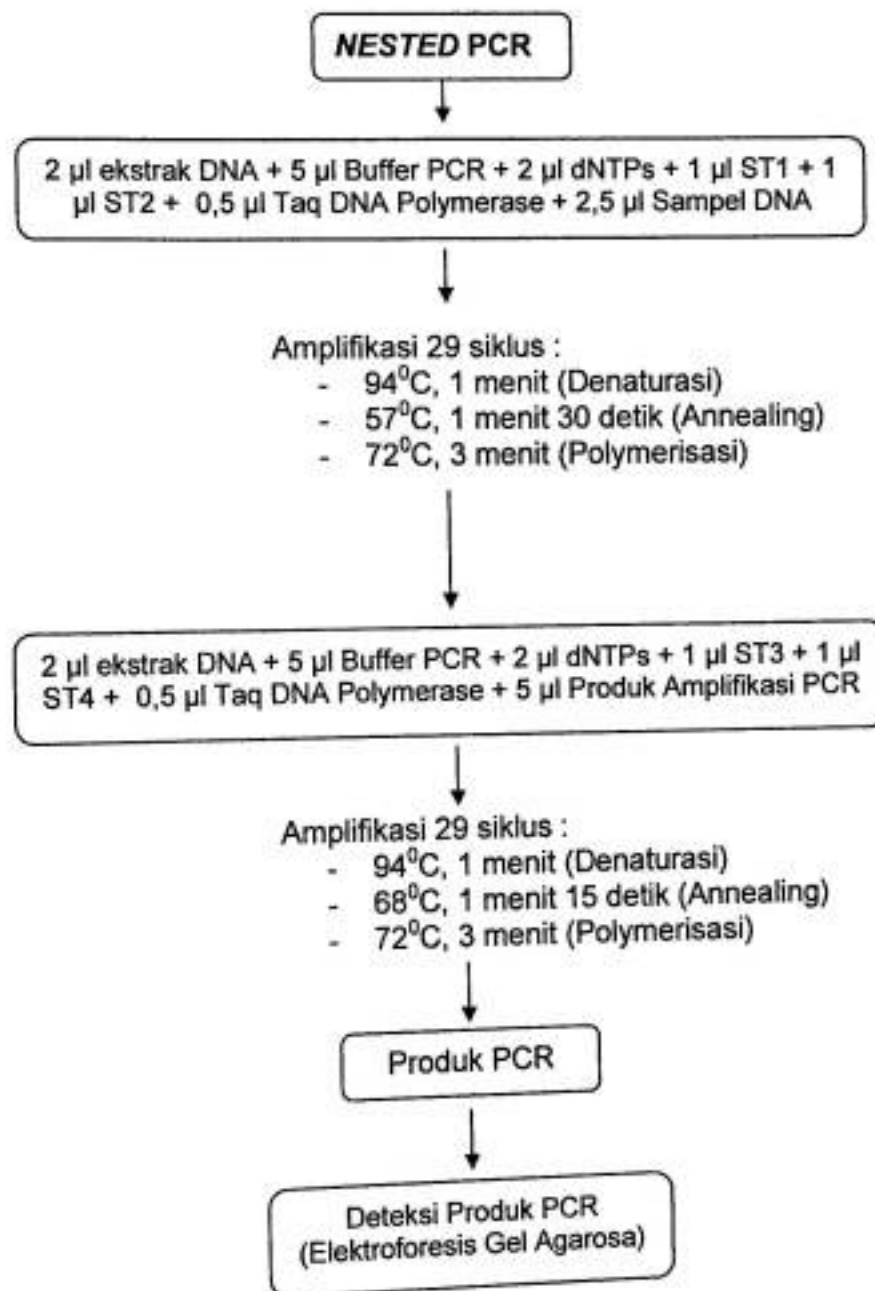
Lampiran 2 :

Isolasi Dan Identifikasi *Salmonella typhi*

Lampiran 3:

Isolasi DNA *Salmonella typhi* dengan Metode Boom

Lampiran 4 :

Deteksi DNA *Salmonella typhi* dengan teknik PCR – Nested PCR

Lampiran 5 :
Deteksi *Gan catP*

PCR Mix : 17,6 μ l dH₂O, 2,5 μ l buffer PCR 10X, 2 μ l dNTPs,
Primer primer*catP* forward (CPNF) dan reverse (CPNR)
masing- masing 0,1 μ l dan 0,2 μ l *Taq* Polimerase



2,5 μ l ekstrak DNA hasil isolasi



Amplifikasi 30 siklus :
Denaturasi (94^oC, 1 menit)
Annealing (57^oC, 1 menit)
Polimerisasi (72^oC, 1 menit)



Produk Amplifikasi



Lampiran 6:

Tabel 2 : Data Sampel Penelitian

NO	NAMA PASIEN	UMUR	SEX	SUHU	GEJALA KLINIS	NO. ERYT	WIDAL	KULTUR	PCR	GEN catP
1	JPR 01	3	L	37	Demam sejak 5 hari yang lalu	1	H1/40, BO1/40	Negatif	Negatif	
2	JPR 02	40	L	37	Diare dan demam 1 Minggu, nyeri	2	O1/80, HC 1/640	Negatif	Negatif	
3	JPR 03	51	L	37	Demam ±2 hari	3	O 1/320	Negatif	Negatif	
4	JPR 04	9	P	38,5	Panas ± 5 hari, nyeri perut	4	O1/160, H1/80	Negatif	Positif	Negatif
5	JPR 05	14	P	38	Panas ± 5 hari, Nyeri perut	5	O1/160, H1/80	Negatif	Negatif	
6	JPR 06	26	P	37,5	Panas 4 hari	6	OB 1/160, HC 1/640	Negatif	Negatif	
7	JPR 07	30	L	37,5	Panas ±, 3 demam, lidah kotor	7	O 1/160	Negatif	Positif	Negatif
8	JPR 08	22	P	38	Panas sejak 3 hari lalu	8	HB 1/160	Negatif	Negatif	
9	JPR 09	32	P	37,5	Panas dingan 3 hari	9	O1/320, HB 1/160	Negatif	Negatif	
10	JPR 10	17	P	37,5	Panas dingain 4 hari	10	O 1/80, H 1/80	Negatif	Negatif	
11	JPR 11	33	P	38	Demam 4 hari, menggigil saat diambil darah	11	O 1/320	Negatif	Positif	Negatif
12	JPR 12	15	P	37,5	Panas 1 minggu	12	O 1/80, H 1/80	Negatif	Negatif	
13	JPR 13	35	L	37,5	Demam sejak 1 minggu	13	H 1/320	Negatif	Negatif	
14	JPR 14	44	L	38	Panas 1 minggu, nyeri perut	14	O 1/320	Negatif	Positif	Positif
15	JPR 15	25	P	37,5	Panas 3 hari, riwayat tifod	15	O 1/160, H 1/320	Negatif	Negatif	
16	JPR 16	24	P	38,5	Demam 1 minggu, riwayat tifoid	16	O 1/640, H 1/160	Negatif	Positif	Negatif

17	JPR 17	33	L	38,5	Panas 4 hari	17	O 1/640	Negatif	Positif	Negatif
18	JPR 18	25	L	38.5	Panas 5 hari	18	O 1/320, H 1/320	Negatif	Negatif	
19	JPR 19	50	L	38.5	Panas 5 hari	19	O 1/640, H 1/640	Negatif	Negatif	
20	JPR 20	31	P	37	Demam 5 hari,nyeri perut	20	O 1/640, H 1/640	Negatif	Positif	Negatif
21	JPR 21	20	P	37.5	Panas 5 hari	21	H 1/320	Negatif	Positif	Negatif
22	JPR 22	3	L	37.5	Panas 4 hari	22	H 1/320	Negatif	Negatif	
23	JPR 23	22	L	38.5	Panas 4 hari	23	H 1/320	Negatif	Positif	Negatif
24	JPR 24	7	L	37.5	Panas 1 minggu,diare 1 minggu	24	O 1/320, H 1/320	Negatif	Negatif	
25	JPR 25	38	P	37.5	Panas 4 hari	25	O 1/320	negatif	Negatif	
26	JPR 26	47	P	37.5	Panas 4 hari	26	O 1/320	Negatif	Positif	Positif
27	JPR 27	35	P	37.5	Panas 1 minggu	27	O 1/320	Negatif	Negatif	
28	JPR 28	40	P	38	Panas 1 minggu	28	O 1/160	Negatif	Negatif	
29	JPR 29	23	P	37.5	Panas 3 hari	29	O 1/160, H 1/320	Negatif	Negatif	
30	JPR 30	11	L	38.5	Panas 1 minggu	30	O 1/160	Negatif	Positif	Negatif
31	JPR 31	30	L	38.5	Panas 3 hari	31	O 1/160	Negatif	Negatif	
32	JPR 32	44	L	37	Panas 3 hari	32	O 1/320	Negatif	Negatif	
33	JPR 33	21	p	37.5	Panas 3 hari	33	O 1/320	Negatif	Positif	Positif
34	JPR 34	23	P	38	Panas 1 minggu	34	O 1/160,OB 1/320	Negatif	Negatif	
35	JPR 35	23	P	37,5	Panas 3 hari	35	H 1/320	Negatif	Positif	Negatif
36	JPR 36	24	L	38	Panas 3 hari	36	O 1/320, H 1/160	Negatif	Positif	Negatif
37	JPR 37	24	L	37,5	Panas 3 hari	37	H 1/320	Negatif	Positif	Negatif
38	JPR 38	18	P	37,5	Panas 3 hari	38	O 1/320	Negatif	Positif	Negatif
39	JPR 39	31	L	37,5	Panas 3 hari	39	O 1/320	Negatif	Positif	Negatif
40	JPR 40	5	P	37,5	Panas 3 hari	40	O 1/320	Negatif	Negatif	
41	JPR 41	20	P	37,5	Panas 3 hari	41	O 1/320	Negatif	Negatif	
42	JPR 42	23	L	38	Panas 5 hari	42	H 1/640	Negatif	Negatif	
43	JPR 43	42	P	37,5	Panas 3 hari	43	H 1/320	Negaif	Negatif	
44	JPR 44	52	L	38,0	Panas 5 hari	44	H 1/320	Negatif	Negatif	
45	JPR 45	42	P	37,5	Panas 3 hari	45	H 1/320	Negatif	Positif	Positif
46	JPR 46	29	P	38,5	Panas 3 hari	46	H 1/320, O 1/160	Negatif	Positif	Negatif
47	JPR 47	28	P	38,0	Panas 3 hari	47	H 1/640, O 1/160	Negatif	Positif	Negatif
48	JPR 48	38	P	37,5	Panas 3 hari	48	O 1/320	Negatif	Negatif	

49	JPR 49	50	L	38,0	Panas 3 hari	49	H 1/320	Negatif	Negatif	
50	JPR 50	11	P	37,5	Panas 2 hari	50	H 1/320	Negatif	Negatif	
51	JPR 51	30	P	38,0	Panas 3 ahri	51	H 1/640	Negatif	Negatif	
52	JPR 52	11	P	38	Demam ± 10 hari	52	O 1/320	Negatif	Negatif	
53	JPR 53	28	P	37,5	Panas 3 hari,nyeri perut	53	O 1/320, H 1/640	Negatif	Negatif	
54	JPR 54	11	L	38,0	Panas 5 hari	54	O 1/320, H 1/640	Negatif	Negatif	
55	JPR 55	11	P	37,5	Panas 4 hari	55	O 1/320	Negatif	Negatif	
56	JPR 56	35	L	37,5	Panas 3 hari	56	O 1/320	Negatif	Negatif	
57	JPR 57	35	P	38,5	Panas 1 minggu	57	O 1/320	Negatif	Positif	Negatif
58	JPR 58	26	L	39	Demam 4 hari	58	O 1/160, H 1/160	Negatif	Positif	Positif
59	JPR 59	9	P	38	Demam 3 hari, lidah putih	59	O 1/320	Positif	Positif	Negatif
60	JPR 60	49	P	37	Demam 3 hari	60	O 1/160	Negatif	Negatif	
61	JPR 61	31	L	38	Demam 3 hari	61	O 1/320	Negatif	Negatif	
62	JPR 62	57	P	37	Demam 3 hari	62	O 1/320	Negatif	Negatif	
63	JPR 63	42	L	37	Demam 3 hari	63	O 1/80	Negatif	Negatif	
64	JPR 64	46	L	38	Demam 3 hari	64	O 1/321, H 1/160	Negatif	Negatif	
65	JPR 65	15	L	37.6	Demam 3 hari, sakit perut	65	O 1/80	Negatif	Positif	Negatif
66	JPR 66	12	P	38	Demam 4 hari, sakit perut	66	O 1/160	Negatif	Positif	Positif
67	JPR 67	8	P	38	Demam 3 hari	67	O 1/160, H 1/160	Negatif	Negatif	

Lampiran 7

Tabel 3 : Gambaran umum penderita demam tifoid berdasarkan jenis kelamin dan umur

UMUR	JENIS KELAMIN		TOTAL
	LAKI – LAKI	PEREMPUAN	
< 12 Tahun	5 (7.5%)	8 (11.9%)	13 (19.4%)
12 – 20 Tahun	1 (1.5%)	6 (9.0%)	7 (10.4%)
21 - 30 Tahun	9 (13.4%)	11 (16.4%)	20 (29.9%)
31 – 40 Tahun	6 (9.0%)	8 (11.9%)	14 (20.9%)
>40 Tahun	8 (11.9%)	5 (7.5%)	13 (19.4%)
Total	29 (43.3%)	38 (56.7%)	67 (100%)

Lampiran 8

Tabel 4 : Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Suhu Tubuh

Suhu Tubuh	Kultur		PCR	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif
37 ⁰ C-38 ⁰ C	1 (1.5%)	54 (80.6%)	17 (25.4%)	37 (55.2%)
>38 ⁰ C	0	12 (17.9%)	8 (11.9%)	5 (7.5%)
TOTAL	1 (1.5%)	66 (98.5%)	25 (37.3%)	42 (62.7%)

Lampiran 9

Tabel 5 : Hasil Kultur dan PCR Berdasarkan Lama Demam

Lama Demam (hari)	Kultur		PCR	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif
< 5	1 (1,5%)	44 (65.7%)	18 (26.9%)	27 (40.3%)
5 – 7	0	21 (31.3%)	7 (10.4%)	14 (20.9%)
>7	0	1 (1.5%)	0	1 (1.5%)
TOTAL	1 (1.5%)	66 (98.5%)	25 (37.3%)	62.7%)42 (

Lampiran 10

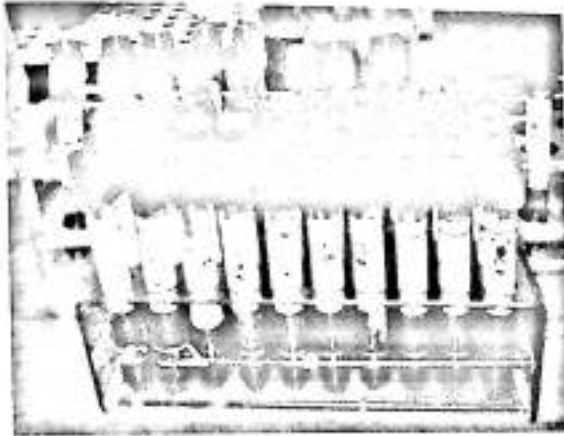
Bahan – Bahan Isolasi DNA

1. Bahan-bahan larutan untuk isolasi DNA dengan metode Boom:
 - a. Buffer L6
 - 120 g GuSCN
 - 100 ml Tris-HCl 0.1 M pH 6.4
 - 22 ml EDTA 0.2 M pH8.0
 - 2.6 ml Troton X-100
 - b. Buffer L2
 - 120 g GuSCN
 - 100 ml Tris-HCl 0.1 M pH 6.4
 - c. Suspensi Celite
 - 10 g Celite (diatome)
 - 445 ml HCl pekat
 - 50 ml Aquadest steril
 - 1 mM Tris pH 8.0
 - 10 mg/ml Proteinase K
 - Tween-20 0.5%
 - 100 Aquadest steril
2. Bahan-bahan untuk larutan PCR :
 - a. Buffer PCR
 - 100 mM Tris-HCl
 - 1.5 mM MgCl₂
 - 50 mM KCl₂

- gelatin 0.1% pH 8.3
3. Bahan-bahan untuk larutan Elektroforesis Gel Agarosa :
- a. Buffer TBE 10X
 - 108 g Tris
 - 27,5 As.Borat
 - 20 ml EDTA 0.5 M pH 8.0
 - HCl
 - 800 ml Aquadest
 - b. Larutan Loading 5X
 - 4 g Sukrosa
 - 25 mg Bromfenol biru
 - 10 ml Aquadest
 - c. Ethium Bromida (EtBr)
 - 0,9 ml EtBr
 - 10 ml Aquadest
 - d. Gel Agarosa 2%
 - 3 g Agarosa
 - 15 ml TBE 10X
 - 135 ml Aquadest
 - 7,5 ml EtBr

Lampiran 11

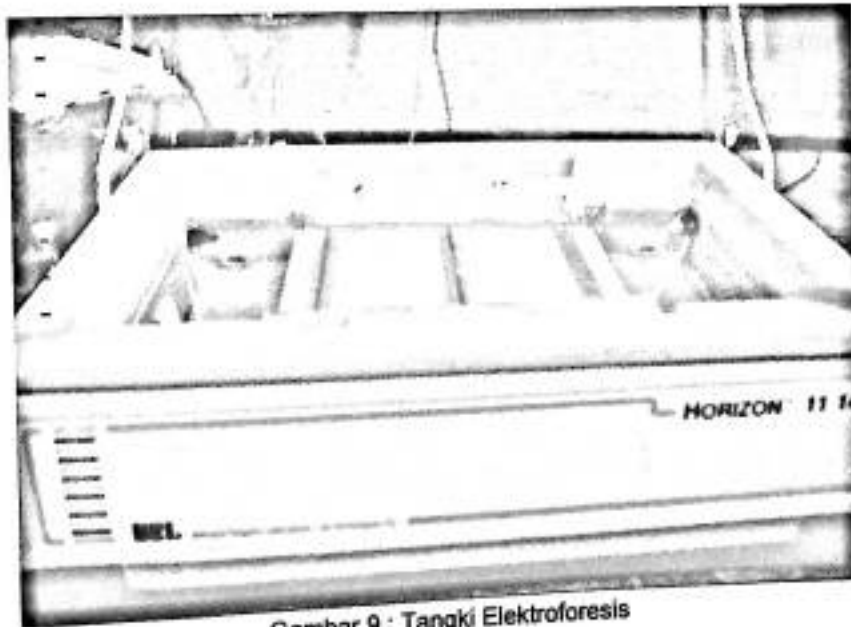
Foto - Foto Alat dan Bahan Penelitian



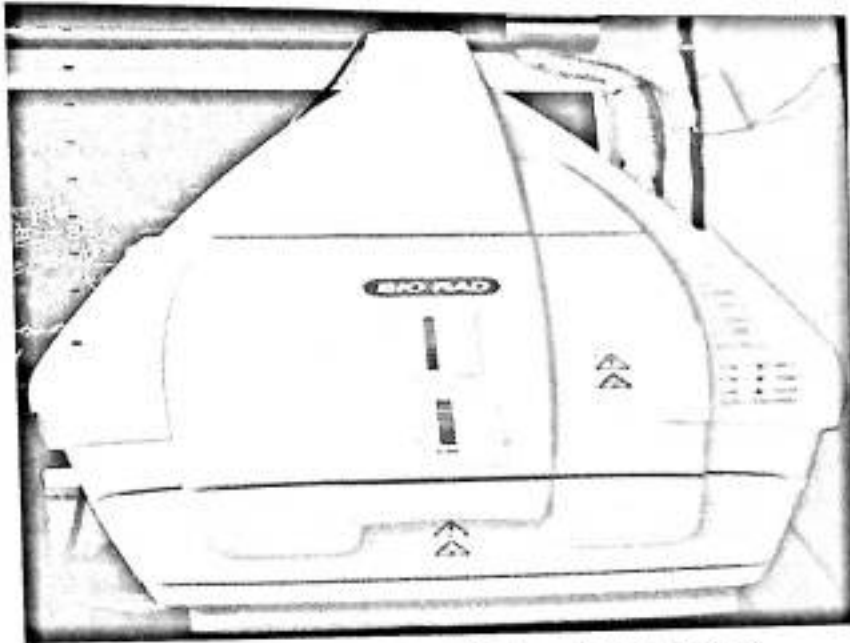
Gambar 7 : Sampel Darah



Gambar 8 : Marker DNA



Gambar 9 : Tangki Elektroforesis



Gambar 10 : Alat Gel Doc (Untuk membaca pita DNA)



Gambar 11 : Thermocycler



PEMERINTAH PROPINSI PAPUA
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH JAYAPURA
Jl. Kesehatan No 1. Dok II Jayapura Telp (0967) 533616, 533567 Fax (0967) 533781
JAYAPURA

SURAT KETERANGAN
Nomor : 800 / 413 / V / 2009

Yang bertanda tangan di bawah ini, Direktur RSUD Jayapura menerangkan bahwa :

Nama : Hamid
NIM : N121 07 008

Yang bersangkutan sementara melakukan pengambilan sampel penelitian di RSUD Jayapura, terhadap kelompok mahasiswa Program Studi Teknologi laboratorium Kesehatan Universitas Hasanudin Makassar (terlampir), bahwa pada prinsipnya kami tidak keberatan dan dapat menyetujui yang bersangkutan untuk melakukan kegiatan tersebut, sepanjang dapat mengikuti ketentuan yang berlaku pada RSUD Jayapura.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan seperlunya.

Jayapura, 28 Mei 2009

Maurits Okoseray RSUD Jayapura

dr. P. Maurits Okoseray
Pembina Utama Muda
NIP 140 248 840



PEMERINTAH DAERAH PROVINSI PAPUA
DINAS KESEHATAN

BALAI LABORATORIUM KESEHATAN JAYAPURA

Jl. Kesehatan Komplek RSUD Dok. II, Jayapura - 99113, Tlp. 0967-532615. Fax. 0967-534304

SURAT KETERANGAN

Nomor : 449.1 / 1555 / 2009

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Balai laboratorium Kesehatan Jayapura menerangkan bahwa :

Nama : Hamid

NIM : N121 07 008

Yang bersangkutan sementara melakukan pengambilan sampel penelitian di Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura, terhadap kelompok mahasiswa Program Studi Teknologi laboratorium Kesehatan Universitas Hasanudin Makassar (terlampir) bahwa pada prinsipnya kami tidak keberatan dan dapat menyetujui yang bersangkutan untuk melakukan kegiatan tersebut, sepanjang dapat mengikuti ketentuan yang berlaku serta diizinkan membawa reagen / zat untuk penelitian dibidang biomedik, bahan-bahan dimaksud tidak toksik dan tidak untuk diperjualbelikan

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan seperlunya.

Jayapura, 24 Februari 2009

KEPALA BALAI LABORATORIUM KESEHATAN
JAYAPURA



SURAT KETERANGAN
Nomor :01 / B / Lab / V / 2009

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N A M A : Muhamad Sidik
N I P : 030 245 222
J A B A T A N : Pelaksana Laboratorium Rumkit
DR Soedibjo Sardadi Jayapura

Menerangkan bahwa :

N A M A : Hamid
N I M : N121 07 008

Yang bersangkutan telah melakukan pengambilan sampel penelitian pada RSAL DR. Soedibjo Sardadi Jayapura terhadap kelompok mahasiswa Program Studi Tehnologi Laboratorium Kesehatan Universitas Hasanudin Makassar(terlampir),bahwa pada prinsipnya kami tidak keberatan dan dapat Menyetujui yang bersangkutan untuk melakukan kegiatan tersebut,sepanjang Dapat mengikuti ketentuan yang berlaku.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat di pergunakan seperlunya.

Jayapura, 25 Mei 2009

An. KARUMKITAL JAYAPURA

PANGKALAN PELAKSANA Laboratorium
KEPALA
MUSAHAMAD SIDIK
Nip. 030 245 222



SURAT KETERANGAN
Nomor :01 / B / Lab / V / 2009

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N A M A : Muhamad Sidik
N I P : 030 245 222
JABATAN : Pelaksana Laboratorium Rumkit
DR Soedibjo Sardadi Jayapura

Menerangkan bahwa :

N A M A : Hamid
N I M : N121 07 008

Yang bersangkutan telah melakukan pengambilan sampel penelitian pada RSAL DR. Soedibjo Sardadi Jayapura terhadap kelompok mahasiswa Program Studi Tehnologi Laboratorium Kesehatan Universitas Hasanudin Makassar(terlampir), bahwa pada prinsipnya kami tidak keberatan dan dapat Menyetujui yang bersangkutan untuk melakukan kegiatan tersebut, sepanjang Dapat mengikuti ketentuan yang berlaku.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat di pergunakan seperlunya.

Jayapura, 25 Mei 2009

An. KARUMKITAL JAYAPURA



Lampiran

**DAFTAR NAMA-NAMA MAHASISWA PROGRAM STUDI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN(TLK) FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR YANG MELAKUKAN PENELITIAN**

1. NAMA : H A M I D
NIM : N121 07 008
JUDUL : Analisis *Flagella* dengan Gen *Flagellin* pada Penderita Demam Tifoid Asal Jayapura dengan Teknik *PCR*.

2. NAMA : RINI SESILIA KELANIT
NIM : N121 07 011
JUDUL : Isolasi dan Purifikasi Antigen Lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhi* Isolat Jayapura dan Reaksi Serologisnya.

3. NAMA : H I E L D A
NIM : N121 07 014
JUDUL : Analisis Gen *CatP* yang Menyandi Resistensi terhadap Kloramfenikol pada *Salmonella typhi* isolat Jayapura dengan Menggunakan Teknik *PCR*.

4. NAMA : PURWANINGSIH
NIM : N121 07 089
JUDUL : Hubungan Immunoglobulin A (IgA) Teknik Elisa dengan DNA *Salmonella typhi* Teknik *PCR* pada Penderita Suspek Demam Tifoid.

5. NAMA : Riny Ariyani Amra
NIM : N121 07 109
JUDUL : Deteksi Antibodi IgM terhadap Lipopolisakarida *Salmonella typhi* Isolat Makassar dengan Teknik Lateral Flow pada Penderita Demam Tifoid di Jayapura.