

DISERTASI

**ANALISIS KEBERADAAN *Salmonella typhi* MDR H58 PADA
PENDERITA DEMAM TIFOID DI MAKASSAR**

*An Analysis on the Existence of Salmonella typhi MDR H58 in Patients
with Typhoid Fever in Makassar*



**JAMILAH
P0200316007**

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**ANALISIS KEBERADAAN *Salmonella typhi* MDR H58 PADA
PENDERITA DEMAM TIFOID DI MAKASSAR**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor Dalam Bidang
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

J A M I L A H

Kepada

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

DISERTASI

**ANALISIS KEBERADAAN SALMONELLA TYPHI MDR H58 PADA PENDERITA
DEMAM TIFOID DI MAKASSAR**

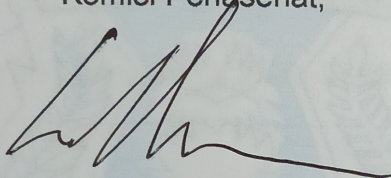
Disusun dan diajukan oleh

**JAMILAH
P0200316007**

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 7 Januari 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

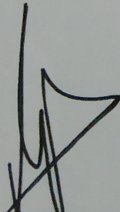


Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Promotor

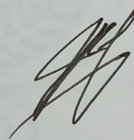


Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

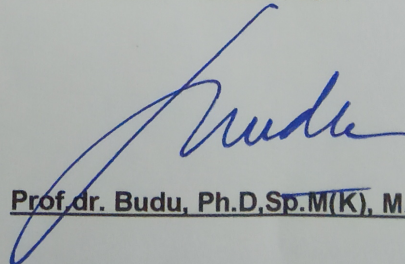


dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK (K)



dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D, Sp.MK
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Jamilah

Nomor Induk Mahasiswa : P0200316007

Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Januari 2020

Yang menyatakan

JAMILAH

DAFTAR TIM PENGUJI

1. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D.Sp.MK(K) (Promotor/Penguji)
2. Prof.dr. Rosdiana Natsir, Ph.D.Sp. Bio (Ko-promotor I/Penguji)
3. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D. (Ko-promotor II/Penguji)
4. Prof. Dr. Yusminah Hala, MS (Anggota/Penguji eksternal)
5. Dr.dr. Burhanuddin Bahar, MS (Anggota/Penguji)
6. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp, PD(K) (Anggota/Penguji)
7. Dr. Rosana Agus, M.Si. (Anggota/Penguji)
8. Dr. Cahyono Kaelan, M.sc., Ph.D (Anggota/Penguji)

PRAKATA

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat disusun dan diselesaikan sebagai salah satu syarat mencapai gelar pendidikan sebagai Doktor. Shalawat dan salam kepada Rasulullah Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat-sahabat dan pengikutnya.

Pertama-tama penulis menyampaikan rasa hormat dan rasa terimakasih yang tak terhingga kepada orang tua saya, Ayahanda H. Kulhua dan Ibunda Hj. Jaweriah atas do'a, kasih sayang, dukungan serta nasehat-nasehat yang berharga pada penulis hingga saat ini. Segenap rasa hormat dan terimakasih kepada Ibu mertua Hj. A. St. Halidjah atas do'a dan perhatiannya kepada penulis.

Penyusunan dan penyelesaian disertasi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga penulis dengan rasa syukur menyampaikan terimakasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. Bapak Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D.Sp.MK(K), selaku Promotor, Ibu Prof.dr. Rosdiana Natsir, Ph.D.Sp. Bio dan Ibu dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D. selaku Ko-promotor yang senantiasa memberikan arahan, perhatian, inspirasi, dukungan, ilmu dan bimbingan dengan

penuh kesabaran hingga disertasi ini dapat diselesaikan. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia yang tak terhingga.

2. Bapak Dr.dr. Burhanuddin Bahar, MS, Ibu dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp, PD(K), Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si., Bapak Dr. Cahyono Kaelan, M.sc., Ph.D selaku penguji dan Ibu Prof. Dr. Yusminah Hala, MS, selaku Penguji eksternal yang telah meluangkan waktu berdiskusi, memberikan arahan dan bimbingan selama penyusunan disertasi ini, Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia yang tak terhingga.
3. Ibu Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA selaku Rektor Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan penulis untuk mengikuti Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin.
4. Bapak Prof. Dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Bapak Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.S (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis mengikuti program pendidikan doktor.
5. Bapak dr. Agussalim Bukhari, M.Clin, Med, Ph.D, Sp.GK(K) selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Bapak Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D.Sp.MK(K), selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan dan mendukung penulis selama mengikuti dan menyelesaikan pendidikan ini.

6. Seluruh dosen beserta staf Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan bantuan, arahan dan bimbingan selama mengikuti pendidikan ini.
7. Seluruh dosen dan staf Program Studi Pendidikan Biologi, para pimpinan Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, dan Tim Kolektif Kolegial UIN Alauddin Makassar atas dukungannya selama penulis menempuh pendidikan ini.
8. Bapak Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D.Sp.MK(K) selaku pimpinan dan Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin; Pak Markus, Pak Mus, Kak Wani dan Kak Romi yang telah memberikan kesempatan dan bantuan bagi penulis dalam mengerjakan penelitian juga diskusi-diskusi yang menambah wawasan dan pengetahuan penulis.
9. Teman-teman “polimorfisme” angkatan 2016 atas dukungan dan kerjasamanya selama ini.

Ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya dan tak terhingga kepada suami tercinta Nur Alamsyah, S.Kel. M.Si. dan anak-anakku tersayang, Besse Almairah Alamsyah, Besse Tenri Faiqah Alamsyah dan Besse Tenri Shofeeah Alamsyah. Terimakasih atas semua pengertian, kesabaran dan kasih sayang dalam mendo'akan, memotivasi, dan mendukung kepada penulis dari awal pendidikan hingga tahap akhir penyelesaian disertasi ini. Terkhusus pula kepada kakak dan adik-adikku, kakak -kakak dan adik ipar ku, terimakasih atas dukungan dan do'anya.

Terimakasih tak terhingga kepada semua pihak yang namanya tidak tercantum dalam prakata ini yang telah banyak membantu penulis. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya serta melipat gandakan segala amal kebaikan seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan. Olehnya, penulis tetap mengharapkan saran dan masukan untuk kesempurnaannya.

Makassar, Januari 2020

Jamilah

ABSTRAK

JAMILAH. *Analisis Keberadaan Salmonella typhi MDR H58 pada Penderita Demam Tifoid di Makassar* (dibimbing oleh **Mochammad Hatta, Rosdiana Natsir** dan **Rizalinda Sjahril**).

Penelitian ini bertujuan mengetahui hasil analisis keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant* H58 dari penderita demam tifoid di Makassar.

Penelitian ini merupakan penelitian *Cross Sectional* mengenai analisis keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant* H58 pada penderita demam tifoid di Makassar. Populasi penelitian ini adalah penderita demam tifoid dan sampel penelitian berupa isolat *Salmonella typhi* yang diambil dari darah pasien penderita demam tifoid di berbagai rumah sakit dan puskesmas di Makassar. Darah yang diambil pada penderita demam tifoid dikultur, dilakukan konfirmasi isolat *S. typhi* dengan PCR, uji sensitifitas antibiotik dengan *disc diffusion* dan dilakukan uji PCR untuk mendeteksi keberadaan plasmid IncH1, gen *gyrA* dan H58. Data yang diperoleh diinterpretasi dan dianalisis secara diskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan dari 367 suspek penderita demam tifoid dari rumah sakit dan puskesmas di Makassar, terkonfirmasi ada 32 (8,2%) penderita yang positif berdasarkan kultur darah. Pada 32 positif kultur darah tersebut, terdapat 27 positif *S. typhi* dengan uji PCR. Berdasarkan uji kepekaan antibiotik menunjukkan ada 7 dari 27 (26%) isolat yang resisten pada satu jenis antibiotik dan 19 dari 27 (70,3%) isolat yang resisten lebih dari satu jenis antibiotik. Tidak terdapat isolat *S. typhi* yang positif membawa plasmid IncH1 dan terdapat 1 isolat yang positif membawa gen *gyrA*, gen terkait resistensi antibiotik golongan quinolon dan 1 isolat *S. typhi* yang menunjukkan fragmen 993 bp yang terkait dengan H58.

Kata kunci : Demam tifoid, *Salmonella typhi*, MDR H58, sensitifitas antibiotik, resisten

ABSTRACT

JAMILAH. *Analysis of MDR H58 Gene Existence in Salmonella typhi Isolated from Typhoid Fever Patients in Makassar* (Supervised by **Mochammad Hatta, Rosdiana Natsir** and **Rizalinda Sjahril**).

This research is aimed at analyzing the MDR H58 gene existence in *Salmonella typhi* isolated from typhoid fever patients in Makassar.

This Cross Sectional research to analyze the MDR H58 gene existence in *Salmonella typhi* isolated from typhoid fever patients in Makassar. The population of the research were typhoid fever patients from various hospitals and primary health centers in Makassar and the sample were *Salmonella typhi* that isolated from the patients blood. The blood was cultured then confirmed with simple PCR. All the samples were tested with disc diffusion tests to know the sensitivity of the isolates towards antibiotics. The existence of IncH1 plasmid, gyrA gene and H58 detected by simple PCR technique. The data were interpreted and analyzed discriptively.

The results shows, of the 367 blood samples from suspected typhoid fever patients that were cultured in blood, there were 32 (8,2%) positive cultures. In the positive culture, there were 30 (8.2%) positive culture of *Salmonella typhi*. Those 30 isolates then confirmed with PCR test and found 27 positive of *Salmonella typhi*. Based on antibiotics sensitivity of disc diffusion tests there were 7 of 27 (26%) isolates resists to one of antibiotics and there were 19 of 27 (70,3%) isolates resists to more than one antibiotics. The PCR examination found no IncH1 plasmid fragments from the isolates. There was one isolate positive for fragment of 347 bp indicates gyrA gene existence, gene that correspond to quinolone resistance and also positive for fragment 993 bp that related to H58.

Keywords : typhoid fever, *Salmonella typhi*, MDR H58, antibiotics sensitivity, resistance

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iv
DAFTAR TIM PENGUJI	v
PRAKATA	vi
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GRAFIK	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Demam Tifoid	9
1. Pengertian Demam Tifoid	9
2. Patogenesis	9
3. Epidemiologi	17
B. <i>Salmonella typhi</i>	19
1. Morfologi	19
2. Klasifikasi	21
3. Struktur Antigen	23
C. Deteksi <i>Salmonella typhi</i>	24
1. Teknik kultur dan serologi	24
2. Teknik Molekuler	26
3. Deteksi <i>Salmonella typhi</i> dengan PCR	28
4. Isolasi DNA dengan teknik Boom	29
D. Antibiotik	30
1. Pengertian	30
2. Pengelompokan antibiotik	31
3. Penggunaan antibiotik dalam terapi	32
4. Jenis-jenis antibiotik dalam terapi demam tifoid	32
5. Antibiotik untuk terapi tifoid	39
6. Penetapan Potensi Antibiotik	40
E. Resistensi Antibiotik	42
1. Pengertian	42
2. Pola Resistensi	43
3. Resistensi Genetik	45
4. Multiple Drug <i>Resistance</i> Demam Tifoid (MDR DT) dan Resisten GyrA	51

F.	Evolusi <i>Salmonella typhi</i>	60
G.	Multiple Drug Resistance (MDR) <i>S. typhi</i> H58.....	66
H.	Definisi Operasional.....	69
I.	Hipotesis	70
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN.....	71
A.	Jenis Penelitian.....	71
B.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	71
C.	Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel.....	71
D.	Analisis Data	72
E.	Bahan dan Alat	72
1.	Bahan	72
2.	Alat	73
F.	Protokol Kerja	73
1.	Kultur dan Identifikasi	73
2.	Uji disc diffusion	73
3.	Isolasi DNA.....	74
4.	Isolasi DNA Plasmid.....	75
5.	Deteksi <i>Salmonella typhi</i>	76
6.	Deteksi Plasmid IncHI1	77
7.	Deteksi Gen GyrA	77
8.	Deteksi <i>S. typhi</i> H58 MDR.....	78
9.	Deteksi produk-produk PCR	79
G.	Alur Penelitian.....	80
H.	Etik Penelitian	81
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	82
A.	Hasil Penelitian	82
1.	Karakteristik penderita demam tifoid.....	82
2.	Hasil uji widal	85
3.	Hasil Kultur darah.....	86
4.	Hasil pemeriksaan dengan Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	87
5.	Uji Kepekaan antibiotik.....	89
6.	Pemeriksaan PCR Plasmid IncHI1 <i>Salmonella typhi</i>	92
7.	Pemeriksaan PCR Gen GyrA <i>Salmonella typhi</i>	94
8.	Pemeriksaan PCR <i>Salmonella typhi</i> H58.....	96
B.	Pembahasan	98
1.	Karateristik, gejala klinis dan diagnosis demam tifoid	98
2.	<i>S. typhi</i> dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan uji sensitivitas antimikroba	101
3.	Lalui deteksi plasmid IncHI1 <i>S. typhi</i> dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR.....	105
4.	Keberadaan Gen GyrA terkait resisten pada fluoroquinolon pada <i>S. typhi</i> dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR	107
5.	Keberadaan <i>S. typhi</i> dari penderita demam tifoid	

yang resisten antibiotik di Makassar berdasarkan teknik <i>simple</i> -PCR <i>S. typhi</i> MDR H58	109
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	113
A. Kesimpulan	113
B. Saran	114
DAFTAR PUSTAKA	115
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	: Representasi secara skematik infeksi <i>Salmonella enterica serovar Typhi</i> pada manusia.....	12
Gambar 2	: Tipe 3 sistem sekresi (T3SS) Bakteri	14
Gambar 3	: Gen Flagelin bakteri <i>Salmonella</i> menstimulasi aktivasi TLR5 dan NF-KB	16
Gambar 4	: Masuknya salmonella ke dalam sel inang yang dimediasi oleh T3SS	17
Gambar 5	: Morfologi <i>Salmonella typhi</i>	20
Gambar 6	: Klasifikasi <i>Salmonella</i> dan penyakit yang ditimbulkan	22
Gambar 7	: Struktur Quinolon	38
Gambar 8	: Transformasi, transduksi atau konyugasi pada bakteri	48
Gambar 9	: Presentasi skematik dari integron kelas 1 dan model akuisisi <i>gene cassette</i>	51
Gambar 10	: Mekanisme resistensi Quinolon	55
Gambar 11	: Uji kompetitif <i>S. typhi</i> H58 dan H1 dengan atau tanpa Plasmid IncHI1	68
Gambar 12	: Hasil elektroforesis DNA <i>S. typhi</i>	88
Gambar 13	: Hasil elektroforesis Plasmid IncHI1.....	93
Gambar 14	: Hasil elektroforesis gen <i>GyrA</i>	95
Gambar 15	: Hasil elektroforesis <i>S. typhi</i> H58	97

DAFTAR TABEL

Tabel 1 : Mekanisme Resistensi terhadap antimikroba	44
Tabel 2 : Gambaran genom Salmonella typhi CT 18.....	65
Tabel 3 : Karakteristik penderita demam tifoid	83
Tabel 4 : Gejala klinis penderita demam tifoid	84
Tabel 5 : Hasil Uji Widal	85
Tabel 6 : Hasil kultur darah suspek penderita demam tifoid	86
Tabel 7 : Hasil Pemeriksaan DNA <i>S. typhi</i> menggunakan PCR	87
Tabel 8 : Hasil Uji Kepekaan <i>S. typhi</i> terhadap antibiotik	89
Tabel 9 : Hasil <i>S. typhi</i> yang resisten pada satu atau lebih antibiotik	91
Tabel 10 : Jenis antibiotik monoresisten dan poliresisten.....	92
Tabel 11 : Hasil Pemeriksaan PCR Plasmid IncH1 <i>S. typhi</i>	93
Tabel 12 : Hasil Pemeriksaan PCR gen GyrA <i>S. typhi</i>	94
Tabel 13 : Hasil Pemeriksaan PCR <i>S.typhi</i>	96

DAFTAR GRAFIK

Grafik 1. Gejala klinis penderita demam tifoid	85
Grafik 2. Hasil uji widal penderita demam tifoid dengan titer 320 pada antigen O dan H sebagai frekuensi tertinggi	86
Grafik 3. Hasil uji kepekaan <i>S. typhi</i> terhadap antibiotik dengan uji <i>disc diffusion</i>	90
Grafik 4. <i>Salmonella typhi</i> yang resisten pada satu atau lebih antibiotik.....	91

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Rekomendasi Persetujuan Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas
- Lampiran 2. Data sampel hasil uji *disc diffusion* dan hasil uji PCR gen *gyrA* dan *H58*
- Lampiran 3. Hasil analisis SPSS
- Lampiran 4. Skema kerja

DAFTAR SINGKATAN

APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
ATP	Adenosine Triphosphate
DFHR	Dyhidrofolate Reductase
DHPS	Dihydropteroate Synthetase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoksinukleotida Trifosfat
EDTA	Diamine Tetra Acetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EtBr	<i>Ethidium Bromida</i>
GuSCN	<i>Guanidium Thiocyanate</i>
IMVIC	<i>Indol Metyl red, Voges Proskauer, Citrate</i>
IS	<i>Insertion Sequence</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
MDR DT	<i>Multiple Drug Resistance Demam Tifoid</i>
MDR	Multidrug Resistant
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PABA	Para-Ami-Nobenzoic Acid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QC-PCR	<i>Quantitative Comparative</i>
RFLP-PCR	Restriction Fragment Length Polymorphism

SCA	Simon citrate Agar
SIM	Solid Indol mutiliti
SIP	Salmonella invasion protein
SNIP	Single Nukleotide polymorphism
SSA	Salmonella Shigella Agar
T3SS	Sistem sekresi protein tipe III
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA,
Tn	Transposon
TSIA	Triple sugar iron agar
WHO	World Health Organization

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam tifoid atau *typhoid fever* merupakan salah satu penyakit infeksi yang sangat umum kejadiannya di negara-negara berkembang. Secara global demam tifoid dilaporkan mencapai 26.9 juta kasus pada tahun 2010 (Buckle *et al.*, 2010). Thong *et al.*, (1995) menyebutkan demam tifoid di Indonesia termasuk tinggi di dunia bersama dengan negara-negara Asia tenggara lainnya (Malaysia dan Thailand) yaitu 1000 kasus /100.000 jumlah penduduk. Angka kejadian demam tifoid di negara-negara berkembang bahkan mencapai 21 juta kasus dengan angka kematian mencapai 216.000 (Maurice, 2012). Di Indonesia penyakit demam tifoid merupakan penyakit endemik dengan jumlah kasus 81.7 per 100.000 orang per tahun (Wain *et al.*, 2014). Sulawesi Selatan, salah satu dari lima pulau terbesar di Indonesia dilaporkan merupakan salah satu pulau yang angka kejadian demam tifoid tertinggi. Kasus-kasus yang terdeteksi pada tahun 1991 mencapai 257 kasus/100.000 populasi dan meningkat menjadi 386 kasus/100.000 populasi pada tahun 2007 (Profil kesehatan Provinsi Sulawesi selatan, Kementerian Kesehatan RI, 2007 dalam Hatta dan Ratnawati, 2008). Pada profil kesehatan provinsi Sulawesi Selatan dilaporkan, pada tahun 2014, tersangka penyakit tifoid tercatat sebanyak 23.271 yaitu laki-laki sebanyak 11.723 dan perempuan sebanyak 11.548, sedangkan penderita demam tifoid sebanyak 16.743

penderita. Pada laporan tersebut juga disebutkan bahwa Makassar termasuk salah satu kasus tertinggi yaitu 2.325 kasus (Profil Kesehatan Sulawesi Selatan 2014, 2015).

Ada beberapa cara *Salmonella typhi* menginfeksi tubuh manusia antara lain karena mengkonsumsi makanan dan minuman yang telah terkontaminasi, *personal hygiene* dan sanitasi lingkungan yang buruk. Demam tifoid disebabkan oleh *Salmonella enterica serovar typhi* (*Salmonella typhi*). Bakteri gram negatif ini terutama menginfeksi manusia dan senantiasa dihubungkan dengan infeksi yang sistemik. Demam tifoid yang berat dapat menyebabkan komplikasi seperti infeksi selaput usus, perdarahan usus dan kebocoran usus. Menurut Keputusan DIRJEN Pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan RI, 2015, tifoid merupakan salah satu penyakit endemis yang ada di Indonesia dan mayoritas mengenai anak usia sekolah dan kelompok usia produktif. Penyakit ini menyebabkan angka absensi yang tinggi dan rata-rata perlu waktu 7 –14 hari untuk perawatan apabila seseorang terkena tifoid. Apabila pengobatan yang dilakukan tidak tuntas maka dapat menyebabkan terjadinya karier yang kemudian menjadi sumber penularan bagi orang lain. Dampak penyakit ini adalah, tingginya angka absensi, penurunan produktifitas, timbulnya komplikasi baik di saluran pencernaan maupun diluar saluran pencernaan, kerugian ekonomi untuk biaya pengobatan dan perawatan, kematian.

Terapi antibiotik merupakan salah satu langkah penting dan sebaiknya dilakukan ketika dugaan klinik telah kuat. Hal ini dapat mengurangi komplikasi dan kasus fatal lainnya. Terapi antibiotik yang efektif merupakan salah satu cara untuk mengurangi kasus dan kematian akibat demam tifoid ini. Akan tetapi, efektifitas antibiotik tersebut semakin berkurang dengan munculnya resistensi antibiotik.

Di negara-negara berkembang, antibiotik yang sering digunakan untuk mengobati demam tifoid adalah Kloramfenikol, Ampisilin, dan Ko-trimokzasol (Mirza *et al.*, 2000). Resistensi kloramfenikol pertama kali dilaporkan pada tahun 1950. Di awal 1970an, ditemukan *Salmonella typhi* resisten terhadap Kloramfenikol dan Ampisilin, tidak lama kemudian ditemukan pula resistensi kepada tiga jenis antibiotik tersebut, atau dikenal dengan istilah *Multidrug resistant* (MDR) (Holt *et al.* 2011). Kasus *Salmonella enterica serovar typhi* membawa plasmid yang mengkode resistensi terhadap Kloramfenikol, Ampisilin, dan Ko-trimokzasol dilaporkan pertama kali di Asia tenggara. Kasus-kasus tersebut semakin meningkat di wilayah tersebut dan kemungkinan menjadi zona pandemik yang dapat melintasi China, Asia tenggara dan benua India (Mirza *et al.* 2000). Di Indonesia, kasus demam tifoid terkait MDR pada Kloramfenikol, Ampisilin, dan Ko-trimokzasol cenderung meningkat setiap tahun. Di Sulawesi selatan, resistensi *S. typhi* terhadap antibiotik sebelum tahun 2001 dilaporkan sangat rendah (<1%) dan sejak tahun 2001 hingga tahun

2007 menunjukkan peningkatan MDR sebesar 1.2% hingga 6.8% (Hatta dan Ratnawati, 2008).

Resistensi antibiotik pada mikroba dapat diketahui dengan menetapkan potensi aktifitas antibiotik secara *invitro*. Penetapan ini dapat dilakukan dengan teknik difusi agar atau disebut juga metode Kirby-Bauer, yang menggunakan cakram kertas yang mengandung antibiotik. Kepekaan terhadap antibiotik dapat dilihat dari diameter hambatan pertumbuhan mikroba disekeliling antibiotik. Kegagalan teknik ini dapat saja terjadi mengingat pengerjaannya secara manual karena berdasarkan fenotip (negatif palsu). Disamping itu, beberapa resistensi antibiotik baru kadang sulit untuk terdeteksi. Deteksi molekuler diharapkan memberikan keakuratan hasil yang lebih tinggi karena langsung melacak gen-gen penyebab resistensi (Jorgensen and Ferraro, 1998).

Awal kemunculan *Multidrug resistant* (MDR) pada *Salmonella typhi* diasosiasikan dengan plasmid IncHI1 yang membawa gen-gen yang resisten terhadap antibiotik dan resistensi terhadap fluoroquinolon yang erat kaitannya dengan mutasi kromosom (Richlyk *et al.* 2005, Ugboko and Nandita De, 2014, Holt *et al.* 2011, Wong, *et al.* 2015). Hasil analisis filogenetik dari urutan DNA genom menunjukkan populasi *Salmonella typhi* secara global merupakan klonal dan berasal dari asal yang sama yang berpindah pada populasi manusia sejak ribuan tahun silam yang kemudian disebut H58 (Roumagnac, *et al.* 2006 dan Holt *et al.* 2008 dalam Wong, *et al.* 2015). H58 merupakan *S. typhi* yang resisten terhadap

antibiotik lini pertama dan juga mengalami mutasi yang menyebabkan resistensi terhadap jenis antibiotik baru seperti ciprofloxacin dan azithromycin. Penguatan keberadaan H58 ini diperkuat dengan frekuensi kemunculannya yang tinggi di berbagai belahan dunia (Wong, *et al.* 2015). Timbulnya kasus-kasus MDR menjadikan cephalosporin dan fluoroquinolon merupakan antibiotik yang kemudian dapat mengobati demam tifoid. Antibiotik tersebut juga telah direkomendasikan oleh WHO sejak tahun 2003. Isolat *S. typhi* yang resisten terhadap cephalosporin dilaporkan masih jarang tetapi resistensi terhadap fluoroquinolon yang disebabkan mutasi pada gen *gyrA* justru mengalami peningkatan secara internasional (Phan Thanh *et al.* 2016). Berdasarkan penelitian oleh Hirose dkk, terindikasi bahwa mutasi pada *gyrA* merupakan hal yang penting mengapa terjadi resisten terhadap fluoroquinolon pada serovar Typhi dan Paratyphi A (Hirose, *et al.* 2002).

Rougmnagnac *et al.* 2006, Holt *et al.* 2011, Phan Thanh *et al.* 2013, menyebutkan bahwa H58 yang secara umum menunjukkan resistensi terhadap sejumlah antibiotik yang dibawa oleh plasmid juga menunjukkan mutasi pada gen *gyrA*.

Berdasarkan temuan tersebut, maka deteksi MDR pada tingkat gen dapat dilakukan secara sederhana dengan keakuratan yang tinggi. Ini berarti deteksi *S. typhi* MDR dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *simple* PCR berdasarkan strain *S. typhi* MDR H58 yang hanya menggunakan sepasang primer. Hal ini dilakukan mengingat

pendeteksian strain *S. typhi* pada penelitian yang telah dilakukan selama ini menggunakan uji sensitifitas antimikroba untuk mengetahui resistensi mikroba secara fenotip atau mengetahui secara genotip dengan menggunakan teknik sekuensing (*whole genome sequencing*), analisis *Single Nukleotide polymorphisms* atau SNIPs *typing*, *cloning*, *Competitive-PCR*, dan *Pulsed-Field-Ge-Electrophoresis* (PFGE). Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk mengadakan penelitian yang bertujuan untuk memperoleh gambaran bagaimana hasil analisis keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant H58* pada penderita demam tifoid di Makassar.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1 Bagaimana sensitivitas antibiotik pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan uji sensitivitas antimikroba?
- 2 Bagaimana keberadaan gen resisten antibiotik melalui deteksi plasmid IncHi1 *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR?
- 3 Bagaimana keberadaan gen *gyrA* terkait resisten pada fluoroquinolon pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR?

- 4 Bagaimana keberadaan *S.typhi* dari penderita demam tifoid yang resisten antibiotik di Makassar berdasarkan teknik *simple-PCR* berdasarkan *S. typhi* MDR H58?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk diketahuinya hasil analisis keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant* H58 dari penderita demam tifoid di Makassar.

2. Tujuan khusus

- a) Diketahuinya sensitivitas antibiotik pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan uji sensitivitas antimikroba
- b) Diketahuinya keberadaan gen resisten antibiotik melalui deteksi plasmid IncHi1 *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR.
- c) Diketahuinya keberadaan gen *gyrA* terkait resisten pada fluoroquinolon pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR.
- d) Diketahuinya keberadaan *S.typhi* dari penderita demam tifoid yang resisten antibiotik di Makassar berdasarkan teknik *simple-PCR* berdasarkan *S. typhi* MDR H58.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Aplikasi

- a. Ditemukan cara yang cepat dan tepat (sensitif dan spesifik) dan lebih sederhana dalam mendeteksi keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant*
- b. Rekomendasi bagi aplikasi klinik mengenai resistensi *S. typhi* dalam langkah penegakan diagnosa demam tifoid dan pilihan obat secara rasional untuk meminimalisir kasus resistensi.

2. Manfaat Pengembangan Ilmu

- a. Sebagai sumber informasi dalam pengembangan analisis filogeografis penyebaran H58 secara global
- b. Sebagai salah satu sumber informasi untuk sequencing dalam melacak variasi genetik dan evolusi *Salmonella typhi*
- c. Sebagai rujukan dalam analisis keterkaitan kromosom, plasmid dan gen resisten antibiotik dalam identifikasi strain *Salmonella typhi* MDR

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Demam Tifoid

1. Pengertian Demam Tifoid

Demam tifoid atau tifoid atau tifus abdominalis sering juga disebut demam enterik. Oleh masyarakat di Makassar penyakit demam tifoid disebut “garring le'leng”.

Penyebab penyakit infeksi ini adalah bakteri *Salmonella enterica* serovar *Typhi* atau *Salmonella typhi*. *Salmonella typhi* masuk ke dalam tubuh melalui makanan atau minuman yang tercemar. KMK, 2006, menyebutkan, diantara gejala klinis yang sering ditemukan pada tifoid adalah; demam, sakit kepala, kelemahan, mual, nyeri abdomen, anoreksia, muntah, gangguan gastro intestinal, insomnia, hepatomegali, splenomegali, penurunan kesadaran, brakikardi relatif, kesadaran berkabut, feses berdarah. Demam tifoid yang berat memberikan komplikasi antara lain: tifoid toksik (tifoid ensefalopati), syok septik, perforasi intestinal, peritonitis, hepatitis tifosa, pankreatitis tifosa, pneumonia dan komplikasi lainnya.

2. Patogenesis

Salmonella typhi merupakan patogen intraselular yang penting. Dari 2.300 serovar *Salmonella* yang memiliki kekerabatan dekat. Hanya *S. typhi* yang secara eksklusif patogen terhadap manusia sebagai penyebab demam tifoid (Zhang *et al*, 2008). Bagi manusia, dosis infeksi rata-rata

untuk menimbulkan infeksi klinik dan sub klinik adalah $10^5 - 10^8$ *S. typhi* (bahkan mungkin cukup dengan 10^3).

Ada berapa hal yang perlu dipahami terkait patogenesis demam tifoid sampai ke tingkat selular dan molekular yaitu:

- a. Sistem sekresi protein tipe III (T3SS)
- b. Gen virulen *Salmonella* yang mengkode lima protein invasi atau *Salmonella invasion protein* (SIP), yaitu SIP A, B, C, D dan E, yang dapat menginduksi apoptosis pada makrofag
- c. Fungsi dari reseptor Toll R2 and Toll R4 yang terdapat pada permukaan makrofag dimana kelompok reseptor Toll sangat menentukan sinyal sel yang dimediasi makrofag yang berhubungan dengan *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) and CD14.
- d. Pertahanan tubuh antara lumen intestinal dan organ dalam
- e. Peranan sel-sel endothelial pada inflamasi dari aliran darah ke jaringan yang terinfeksi bakteri

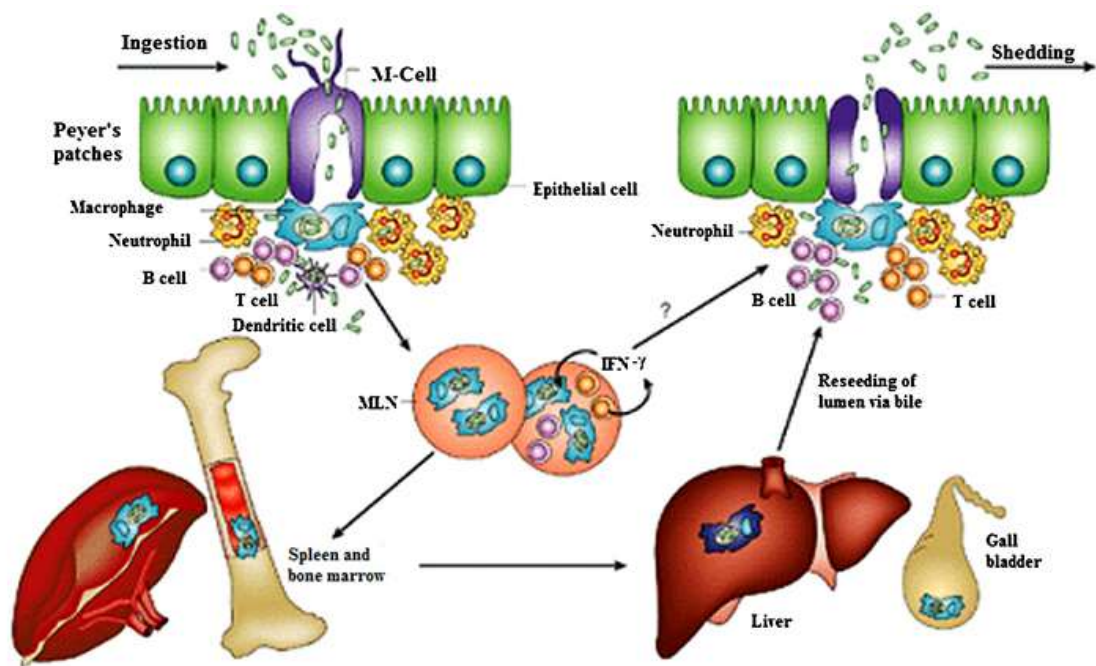
Rendahnya pH asam lambung merupakan salah satu mekanisme pertahanan awal yang penting terhadap bakteri. Bakteri harus melalui asam lambung yang rendah untuk mencapai usus halus. Pada usus halus, bakteri akan bergerak mencapai sel epitel usus atau *Intestinal Epithelial Cell* (CEI) dan mencapai sel-sel M, masuk berpenetrasi pada plak Peyer (gambar 1.). Sel M merupakan sel epitelial yang terspesialisasi yang terdapat pada plak Peyer yang mungkin berasal dari CEI dan permukaan mukosa. Setelah kontak dengan sel M, bakteri

penginfeksi akan mengalami internalisasi dan mencapai kelompok *Antigen-Presenting Cells* (APCs), dan nantinya akan dinetralisasi dan difagositasi secara parsial. Fagosit yang terinfeksi akan menjadi lesi patologik yang dikelilingi jaringan normal. Formasi lesi ini merupakan proses yang dinamis dan membutuhkan keberadaan molekul adhesi seperti ICAM1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) dan aksi dari cytokine- cytokine [*tumor necrosis factor* (TNF)-*interleukin* (IL)-12, IL-18, IL-14, IL-15 dan *interferon* (IFN)-]. Beberapa bakteri dapat lolos hambatan ini dan mencapai folikel limfoid (plak Peyer), terbentuk terutama oleh sel-sel mononuklear seperti limfosit T juga sel-sel dendritik atau *Dendritic Cells* (DC). DC merupakan antigen bakteri yang akan mempengaruhi aktivasi limfosit T dan B (Kaur, J, and Jain, S.K. 2011)

Hal penting terkait patogenesis berikutnya adalah penyebaran bakteri pada lamina propria mukosa di usus. Pada saat sel limfosit T dan B keluar dari nodul limfatik, mencapai hati dan limpa melalui sistem reticuloendothelial, bakteri yang terdapat di organ tersebut umumnya mati difagositosis oleh sistem makrofag. Meskipun demikian, masih ada saja *Salmonella* yang bertahan hidup dan memperbanyak diri di dalam sel fagositik mononuclear. Tingkat ambang batas ditentukan oleh jumlah bakteri, virulensi bakteri, dan respon imun inang, bakteri dilepaskan dari habitat interselulernya ke aliran darah. Fase ini disebut fase bacteremia yang ditandai dengan penyebaran kuman. Tempat infeksi sekunder

umumnya adalah hati, limpa, sumsum tulang, kantung empedu dan plak Peyer pada ileum terminal.

Di hati, *S. typhi* mempengaruhi aktivasi sel Kupffer. Sel Kupffer ini memiliki kemampuan membunuh mikroba yang tinggi dan netralisasi terhadap bakteri dengan senyawa oksidatif radikal bebas yaitu *nitric oxide* yang bertindak sebagaimana enzim dalam mengaktifkan pH asam. Bakteri yang masih bertahan hidup akan menginvasi hepatosit dan menyebabkan kematian sel melalui apoptosis.



Gambar 1. Representasi secara skematik infeksi *Salmonella enterica serovar Typhi* pada manusia.

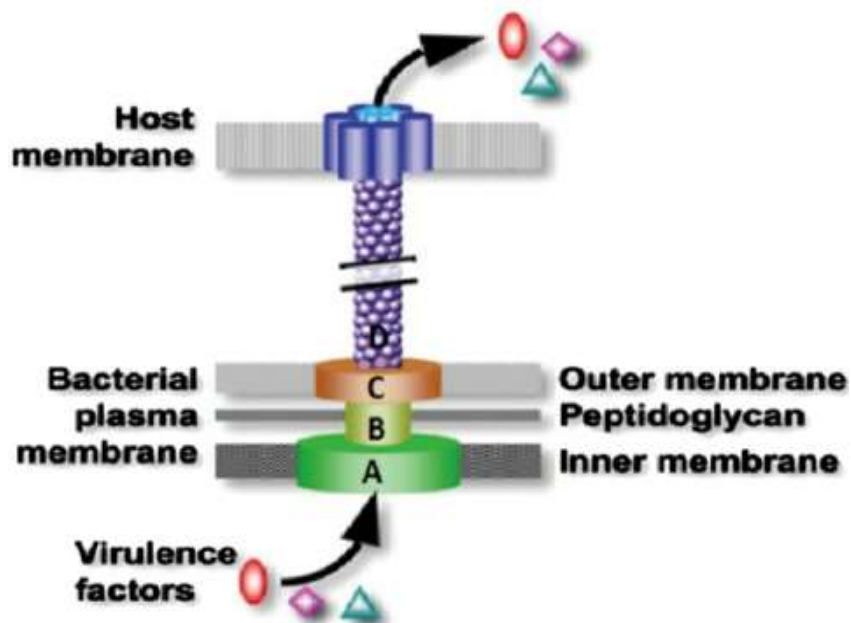
Bakteri memasuki plak payer pada permukaan mukosa saluran usus dengan menginvasi sel M. Sel M merupakan sel epitel yang mengalami spesialisasi yang berperan dalam mengambil dan melakukan transcytose antigen luminal oleh sel imun fagositik. Hal ini kemudian

diikuti dengan inflamasi dan fagositosis bakteri oleh neutrophil dan makrofag dan perekrutan sel T dan B. Pada demam tifoid, salmonella dapat menjadi target sel-sel inang yang spesifik seperti sel denritik atau makrofag yang menyebar melalui limfatik dan aliran darah ke nodus limfa mesentrik atau Mesenteric Lymph Nodes (MLNs) dan ke jaringan yang lebih dalam lagi. Hal ini akan menyebabkan perpindahan ke limpa, sumsum tulang, hati dan kantung empedu. Bakteri dapat bertahan di MLN, sumsum tulang, dan kantung empedu seumur hidup dan secara periodik memperbanyak diri ke permukaan mucosal melalui saluran empedu dan atau MLN usus. Interferon-(IFN-), yang disekresikan oleh sel T memiliki peran dalam mengontrol replikasi intraseluler Salmonella. Interleukin (IL)-12, yang dapat meningkatkan produksi IFN- dan proinflamasi cytokine Tumor-Necrosis Factor-(TNF-) juga berkontribusi dalam mengontrol Salmonella yang tetap bertahan. (Denise et al. 2004 dalam Kaur, J, and Jain, S.K. 2011.).

Endotoksin yang dihasilkan oleh *S. typhi* merupakan kompleks lipopolisakarida dan dianggap berperan penting pada patogenesis demam tifoid. Endotoksin bersifat pirogenik serta memperbesar reaksi peradangan dimana *S. typhi* berkembang biak. Karena sifatnya intraseluler, maka hampir semua bagian tubuh dapat diserang dan kadang-kadang pada jaringan yang terinvansi dapat timbul fokal-fokal infeksi. Kandung empedu merupakan tempat yang disenangi basil salmonella. Jika penyembuhan tidak sempurna, basil tetap tahan di kandung empedu ini, mengalir ke

dalam usus, sehingga menjadi karier intestinal. Demikian juga ginjal dapat mengandung basil dalam waktu yang lama sehingga dapat menjadi karier (urinary carrier). Adapun tempat-tempat yang menyimpan basil tersebut, memungkinkan penderita mengalami kekambuhan (relaps) (KMK, 2006).

Gen untuk faktor virulensi *Salmonella* mengerucut pada *pathogenesis islands* (SPI). Pada spesies *Salmonella* yang non-patogenik tidak memiliki PI. Ada dua SPI yang mengkode Tipe 3 Sistem Sekresi (T3SS), dimana T3SS ini merupakan sistem sekresi yang memindahkan protein-protein virulensi bakteri selama infeksi (gambar 2).



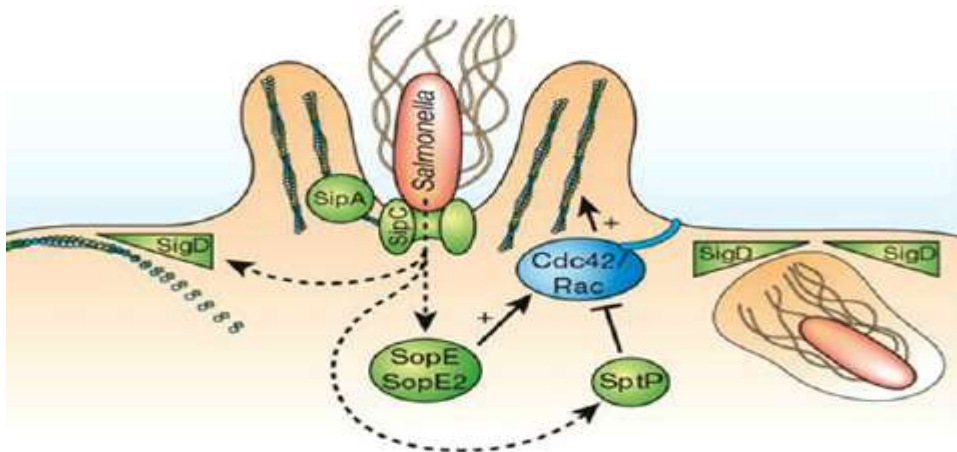
Gambar 2: Tipe 3 sistem sekresi (T3SS) yang digunakan oleh bakteri untuk translokasi faktor-faktor virulensi bakteri ke inang selama infeksi. Tanpa T3SS ini, invasi ke sel inang tidak akan terjadi (Zhang *et al*, 2008).

Terjadinya adesi, invasi, dan injeksi toksin salmonella tidak lepas dari peranan SPI, yang terletak di dalam kromosom dan plasmid bakteri. Setiap kluster dari kromosom mengkode SPI yang berbeda beda. Sampai saat ini telah dipelajari kurang lebih 15 jenis SPI, namun hanya SPI 1 dan SPI 2 yang telah dikaji secara mendalam, karena keterkaitannya dengan T3SS (Zhang *et al*, 2008). Tipe 3 Sistem Sekresi (T3SS) dan efekturnya dikode oleh SPI 1 yang diperlukan untuk invasi sel-sel epitel dan diaktivasi begitu terdapat pada lumen intestinal sebelum invasi sel iang. SPI 1 mengsekresikan efektor SopE dan SoPE2 yang bertindak sebagai Faktor pertukaran nukleotida guanin atau *Guanine-nukleotide Exchange-Factors* (GEFs) bagi GTPase Cdc42 dan Rac. SipA dan SipC mengubah struktur sitoskelet dimana, SipC nukleasi aktin dan menginisiasi polimerisasi sementara SipA mengikat aktin dan memodulasi gabungan aktin (Zhang *et al*, 2008).

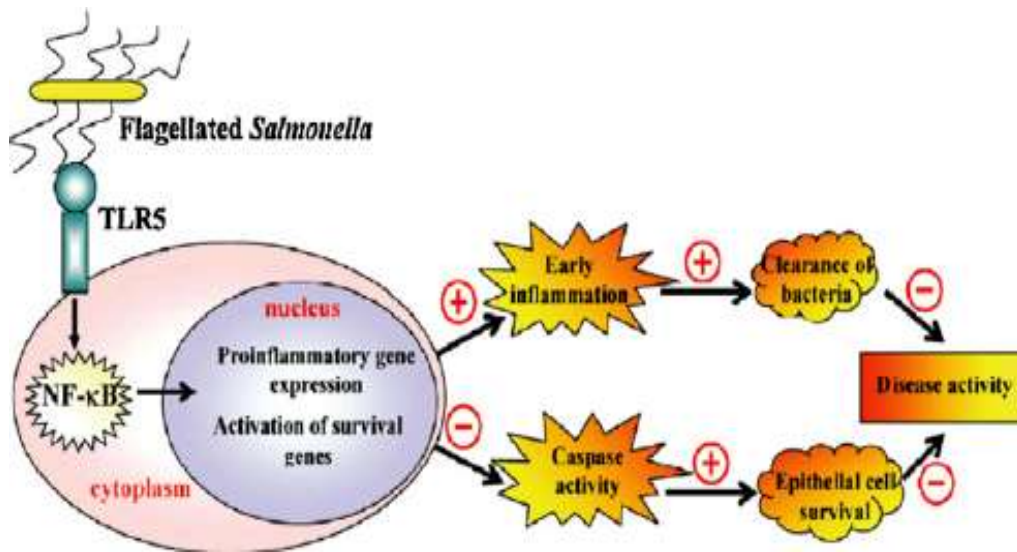
Pengaturan ulang bentuk sitoskelet ini diatur oleh aktivitas GAP (GTPase-activating protein) dari SptP berada (protein bifungsional dimana domain GAPnya berada pada terminus amino dan domain protein tirosin fosfatnya berada pada terminus karboksil) SptP ini menginaktifkan Cdc42 dan Rac. SigD juga terlibat dalam menginvasinasi bagian membrane plasma untuk membentuk vakuola interseluler (Gambar 3). SPI 2 mengkode T3SS kedua, efektor protein, *chaperone* molekuler dan dua sistem regulator yang mengaktifkan promotor SPI 2. Selain dua PI tersebut, ada PI lain yang berperan dalam virulensi dan kemampuan

bakteri bertahan hidup yaitu SPI 3, SPI 4 dan SPI 5. Adapun SPI 7 berperan dalam menghasilkan kapsul polisakarida Vi (Zhang *et al*, 2008).

Salmonella berinteraksi dengan sel nonfagositik dan sel fagositik. Woolwine *et al.* 1998 dan Wyant *et al.* 1999 melaporkan bahwa flagella *Salmonella typhi* dapat menginduksi sitokin untuk melepaskan monosit manusia dan APC oleh makrofag. Hal ini diperkuat oleh Hiyashi *et al.* 2001 yang menyebutkan bahwa flagelin merupakan komponen yang mengaktifkan TLR5 (Gambar 4.)



Gambar 3: Gen Flagelin bakteri Salmonella menstimulasi aktivasi TLR5 dan NF- κ B, menekan apoptosis epithelial dan membatasi penyakit selama infeksi interik (Zhang, *et al.* 2008)



Gambar 4 : Masuknya salmonella ke dalam sel inang yang dimediasi oleh T3SS dan efekturnya yang dikode oleh SP1 (Zhang *et al*,2008)

3. Epidemiologi

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit infeksi yang sangat umum kejadiannya di negara-negara berkembang. Di negara-negara berkembang, demam tifoid salah satu masalah kesehatan publik yang penting. Pada tahun 2000, terjadi 21,7 juta lebih kasus tifoid yang terjadi di seluruh dunia, dan dari kasus tersebut terjadi 217.000 kematian dimana 90% morbiditas dan mortalitasnya terjadi di Asia (Crump dan Mintz, 2010).

Di Indonesia, tifoid harus mendapat perhatian serius dari berbagai pihak karena penyakit ini bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Permasalahannya semakin kompleks dengan meningkatnya kasus-kasus karier atau relaps dan resistensi terhadap obat-obat yang dipakai belum ada laporannya secara pasti sehingga menyulitkan upaya pengobatan dan pencegahan. Berdasarkan telaah kasus di rumah sakit

besar di Indonesia, tersangka demam tifoid menunjukkan kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun dengan rata-rata kesakitan 500/100.000 penduduk dan angka kematian antara 0.6–5% (KMK, 2006). Menurut Wain *et al.*, 2015, tifoid di Indonesia mencapai 81.7 per 100.000 orang per tahun.

Sulawesi selatan, salah satu dari lima pulau terbesar di Indonesia dilaporkan merupakan salah satu pulau yang angka kejadian demam tifoid tertinggi. Kasus-kasus yang terdeteksi pada tahun 1991 mencapai 257 kasus/100.000 populasi dan meningkat menjadi 386 kasus/100.000 populasi pada tahun 2007 (Profil kesehatan Provinsi Sulawesi selatan, Kementerian Kesehatan RI, 2007 dalam Hatta dan Ratnawati, 2008). Pada tahun 2014, tersangka penyakit tifoid tercatat sebanyak 23.271 yaitu laki-laki sebanyak 11.723 dan perempuan sebanyak 11.548. Sedangkan penderita demam tifoid dilaporkan sebanyak 16.743 penderita dimana laki-laki sebanyak 7.925 dan perempuan sebanyak 8.818 penderita. Pada laporan tersebut juga disebutkan bahwa Makassar termasuk salah satu kasus tertinggi yaitu 2.325 kasus (Profil Kesehatan Sulawesi Selatan 2014, 2015)

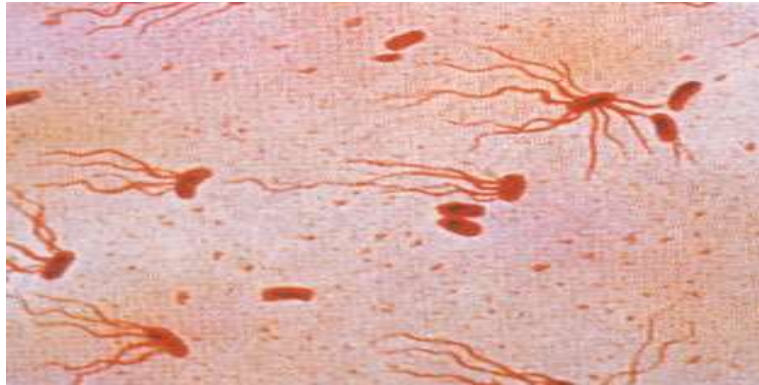
Faktor-faktor yang mempengaruhi penyebaran penyakit ini antara lain melalui air yang dikonsumsi di tempat kerja, air minum yang tidak dimasak, air yang bukan berasal dari pemerintah. Penyebaran melalui makanan dapat berasal dari es krim ataupun makanan yang umumnya dijajakan di jalan. Faktor-faktor umum antara lain tingginya kepadatan

penduduk, kondisi tempat tinggal yang tidak sehat, perilaku hidup sehat yang rendah, status sosial ekonomi yang rendah dan kontak terhadap penderita demam (Crump dan Mintz, 2010). Hal yang serupa juga dinyatakan dalam KMK, 2016, bahwa penularan basil salmonella ke manusia melalui makanan dan minuman yang telah tercemar komponen urin atau feses penderita demam tifoid. Beberapa kondisi kehidupan manusia yang sangat berperan pada penularannya adalah: hygiene perorangan dan makanan/minuman yang rendah, sanitasi lingkungan tidak memenuhi syarat-syarat kesehatan, penyediaan air bersih untuk warga yang tidak memadai, jamban keluarga yang tidak memenuhi syarat, pasien atau karier tifoid yang tidak diobati secara sempurna, belum membudaya program imunisasi untuk tifoid.

B. *Salmonella Typhi*

1. Morfologi

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri berbentuk batang berukuran 0,7-1,5 μm x 2.0-5,0 μm . Sebagian besar salmonella yang diisolasi adalah motil dengan flagel peritrik (Gambar 5). *S.typhi* mempunyai karakteristik memfermentasikan glukosa dan dan mannose tanpa memproduksi gas dan tidak memfermentasikan laktosa dan untuk tumbuh memerlukan triptofan sebagai faktor pertumbuhan.



Gambar 5: Morfologi *Salmonella typhi*

(http://textbookofbacteriology.net/salmonella_2.html)

Pada media MacConkey koloni tampak transparan karena bakteri tidak memfermentasikan laktosa dengan diameter koloni 2-4 mm. Media MacConkey adalah media yang mengandung garam empedu dan Kristal violet yang fungsinya dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Media tersebut juga mengandung laktosa dengan indikator *neutral Red* yang menunjukkan perubahan pH sehingga membedakan antara bakteri yang memfermentasikan laktosa secara cepat, lambat atau tidak (Talaro *et al*, 2002). Untuk identifikasi strain anggota familia *Enterobacteriaceae* dilakukan serangkain uji biokimia IMVIC (*Indol Metyl red, Voges Proskauer, Citrate*).

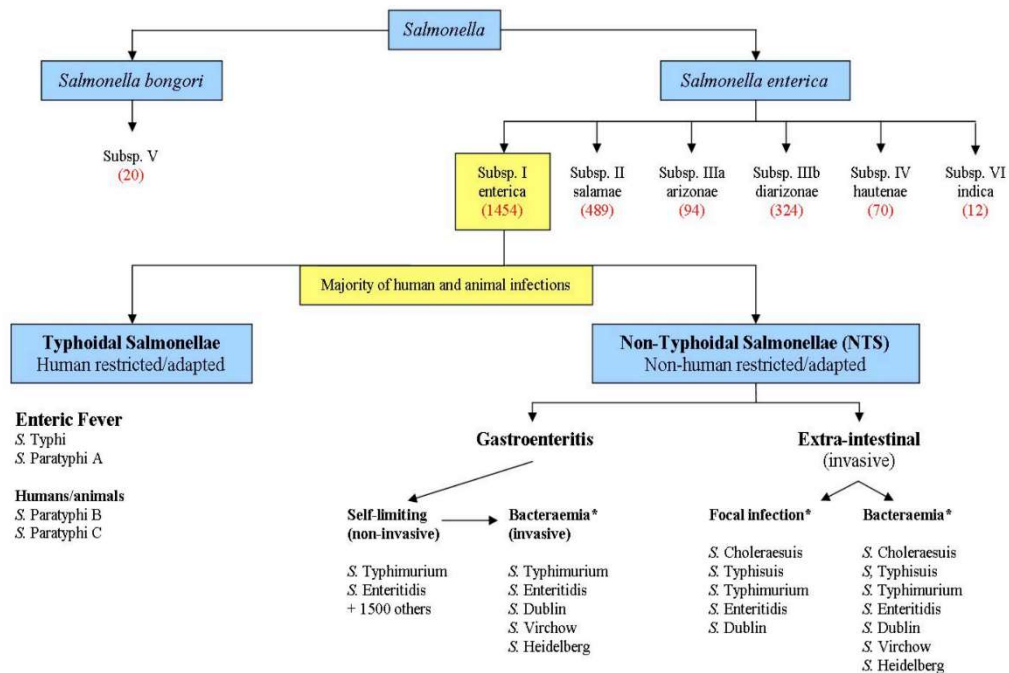
Bakteri *S. typhi* juga memiliki pilli atau fimbriae yang berfungsi untuk adesi pada sel host yang terinfeksi. Pilli merupakan bentukan batang lurus dengan ukuran lebih pendek dan lebih kaku bila dibandingkan dengan flagella. Pilli tersusun atas unit protein yang disebut pillin, mempunyai struktur yang berbentuk pipa, mempunyai peran dalam

proses konjugasi, sebagai reseptor bagi bakteriofag dan berperan pula dalam proses pelekatan (adesi) antara bakteri dan permukaan sel inang.

Oleh karena itu pilli mempunyai peran dalam proses potogenesis bakteri, selain itu pilli mampu menginduksi terbentuknya respon imun pada hewan terinfeksi. Suatu bakteri dapat memiliki beberapa tipe pilli yang berbeda dalam panjang dan tebalnya, spesifisitas reseptornya. Beberapa spesies bakteri dari familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinea*, *Serratia*) memiliki pathogenesis yang berbeda akibat perbedaan tipe pili ini.

2. Klasifikasi

Salmonella adalah genus bakteri yang berasal dari familia Enterobacteriaceae, dan merupakan patogen yang bertanggungjawab terhadap penyakit pada manusia dan hewan. Salmonella dibagi menjadi dua spesies yaitu *bongori* dan *enterica* (Gambar 6).



Gambar 6: Klasifikasi *Salmonella* dan penyakit yang ditimbulkan (Langridge, Wain and Nair, 2009 dalam Phan, 2009)

Salmonella enterica kemudian dibagi menjadi enam subspecies yaitu *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* dan *indica*, yang memiliki lebih dari 2,500 serovar atau serotype. *Salmonella enterica* kemudian dibagi menjadi enam sub spesies. *Enteric*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* dan *indica* (berdasarkan hybridisasi DNA, analisis dan elektroforesis multilokus enzim 16S RNA (Crosa *et al.* 1973; Tindall). Umumnya lebih dari 99,9% *S. enteric serovar* merupakan subspecies *enterica* dan berhubungan infeksi pada manusia dan hewan (Selander *et al.*, 1996).

Berikut adalah klasifikasi *Salmonella typhi* dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Bergey, 1974):

Kingdom : Plantae
Divisi : Protophyta
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : Salmonella
Spesies : *Salmonella typhi*

3. Struktur Antigen

Seperti bakteri yang lain, Salmonella memiliki variasi permukaan yang berperan untuk melindungi sel, transport membran, adhesi, kemotaksis, motilitas dan reseptor. Hal tersebut berperan dalam respon imun dan dasar identifikasi serologi di laboratorium. Antigen permukaan *S. typhi* cukup kompleks dan mempunyai peran penting dalam patogenitas.

Struktur antigen Salmonella berdasarkan analisis antigenik White dan Kauffmann yaitu: *Antigen somatik (O)*, *antigen flagella (H)* dan *antigen kapsular*. Antigen O (*Ohne*) merupakan antigen somatik dengan lipopolisakarida yang kompleks. Antigen ini bagian dari dinding sel dan senantiasa diasosiasikan dengan endotoksin. Antigen flagella H (*Hauch*) merupakan struktur protein yang berasosiasi dengan flagella. Spesifitas antigen ini tergantung bagaimana protein yang ada dalam flagella (fase motil atau non-motil) (O'leary, 1989). Antigen Vi (*Virulence*) adalah antigen kapsuler yang tersusun atas polimer asam uronik galaktosamin yang diasosiasikan dengan virulensi. Antigen ini terdapat pada semua strain *S.*

typhi (Hashimoto *et al.*, 1995). Antigen O disebut juga sebagai antigen dinding sel karena antigen tersebut adalah *outer layer* dari dinding sel bakteri Gram negatif. Antigen O tersusun atas Lipopolisakarida (LPS) yang berperan sebagai endotoksin, resisten terhadap pemanasan 100 °C, alkohol dan asam. Reaksi aglutinasinya berbentuk butir-butir pasir (Joklik *et al.*, 1990). Antigen H bersifat termolabil dapat rusak oleh alkohol, pemanasan pada suhu di atas 60 °C dan asam (Prescott *et al.*, 2005) Antigen H atau antigen flagel terdiri dari suatu protein yang dikode oleh gen *flg* yang berada pada lokus *fliC*. Antigen H terdiri dari dua fase yaitu antigen H fase 1 (H1) dan antigen H fase 2 (H2) sehingga terdapat *S. typhi* serovar H1 dan *S. typhi* serovar H2. Sedangkan antigen H1 terdiri dari H1-d dan H1-j sehingga dapat dijumpai *S. typhi* serovar H1-d yang tersebar di seluruh dunia dan *S. typhi* serovar H2-j yang hanya dijumpai di Indonesia. Strain bakteri *S. typhi* serovar H-J bersifat kurang motil pada media semi solid agar dan kurang invasif apabila dibandingkan dengan *S. typhi* serovar H-d (Grossman, *et al.*, 1995).

Antigen Vi adalah antigen kapsuler yang tersusun atas polimer asam uronik galaktosamin yang diasosiasikan dengan virulensi. Antigen ini terdapat pada semua strain *S. typhi* (Hashimoto *et al.*, 1995).

C. Deteksi *Salmonella typhi*

1. Teknik kultur dan serologi

Gambaran klinis demam tifoid sangat bervariasi dari hanya penyakit ringan yang tidak terdiagnosis, sampai gambaran penyakit yang khas

dengan komplikasi dan kematian. Hal ini menyebabkan kesulitan dalam menegakkan diagnosis demam tifoid apabila hanya berdasarkan gambaran klinis. Oleh karena itu pemeriksaan laboratorium mikrobiologi tetap diperlukan untuk memastikan penyebabnya. Tes ideal untuk suatu pemeriksaan laboratorium seharusnya sensitif, spesifik dan cepat diketahui hasilnya.

Keberadaan *Salmonella typhi* pada suatu bahan dapat dideteksi dengan berbagai metode. Diagnosis biasanya dikonfirmasi dengan kultur bakteri dan uji widal sebagai uji konvensional (Duthie and Franch, 1990). Pada tatalaksana klinis demam tifoid, kultur dilakukan dengan penanaman dilakukan dalam biakan empedu (*gaal culture*, biakan SS). Sensitivitas uji ini rendah jika pasien telah mendapatkan antibiotik sebelumnya, pengambilan spesimen yang tidak tepat, volume darah yang diambil kurang dan lain-lain. Adapun uji widal adalah reaksi antara antigen (suspensi *S. typhi*) dengan agglutinin yang merupakan antibody spesifik terhadap komponen basil *S. typhi*. Prinsip tes adalah terjadinya reaksi aglutinasi antara antigen dan agglutinin yang dideteksi yaitu agglutinin O dan H. Menurut KMK, 2006, Interpretasi reaksi widal belum ada kesepakatan tentang nilai titer patokan. Masing-masing daerah endemis berbeda-beda tergantung hasil penelitian di daerah tersebut. Kebanyakan berpendapat bahwa titer O 1/320 sudah menyokong kuat diagnosis demam tifoid. Adapun widal negatif tidak menyingkirkan diagnosis tifoid.

Diagnosis ini dianggap pasti apabila diperoleh kenaikan titer 4 kali lipat dalam pemeriksaan ulang dengan interval 5-7 hari.

2. Teknik Molekuler

Metode lain untuk mendeteksi *S. typhi* yaitu teknik molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, *Enzyme Immunoassay Dot (EIA)* dan *Dipstick Assay*. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* adalah teknik *in vitro* yang digunakan untuk mengamplifikasi sejumlah kopi bagian DNA yang spesifik. Teknik ini dikembangkan oleh Kary B. Mullis dan Fred A. Faloona pada tahun 1983. Mullis (1990) menjelaskan, hanya dengan satu untai bahan genetik maka PCR akan memperbanyak hingga 100 juta molekul yang sama. Pengerjaannya mudah, sampel DNA dapat berupa DNA yang telah dimurnikan dari bahan biologik yang kompleks. DNA tersebut dapat berasal dari jaringan, tetesan darah kering bahkan dari mikroorganisme yang sulit dikultur.

Prinsip kerja dalam PCR mirip dengan proses replikasi yang terjadi di dalam sel. PCR membutuhkan templat (untai DNA yang mengandung urutan DNA target), enzim DNA *Taq polymerase*, deoksinukleotida trifosfat atau dNTP (dATP, dGTP, dTTP dan dCTP) dan sepasang primer oligonukleotida.

Primer oligonukleotida disintesis dengan menggunakan *DNA synthesizer*. Perancangan primer dimulai dengan membandingkan semua urutan dari bagian DNA yang bervariasi. Primer kemudian dipilih dari

bagian 3' dan 5' pada urutan yang spesifik (Dieffenbach and Gabriella, 1995). Tujuan perancangan primer adalah untuk mendapatkan spesifitas dan efisiensi amplifikasi. Spesifitas umumnya di kontrol oleh panjang primer dan temperatur tahap *annealing*. Persamaan untuk menentukan temperatur tahap annealing adalah $T_m = 4\text{ }^{\circ}\text{C} (\text{G} + \text{C}) + 2\text{ }^{\circ}\text{C} (\text{A} + \text{T})$ (Suggs *et al.*, 1981 dalam Dieffenbach and Gabriella, 1995).

Dalam teknik PCR terdapat beberapa siklus dan setiap siklus terdiri atas tiga tahap berurutan yaitu: tahap denaturasi dimana terjadi pemisahan untai ganda DNA templat pada temperatur 90-94 °C. Tahap kedua, temperatur diturunkan menjadi 37-65 °C (tergantung primer yang digunakan) sehingga kedua primer menempel pada untai DNA target. Tahap berikutnya elongasi atau polimerisasi dengan temperatur 72 °C. pada tahap ini, DNA taq polymerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templatnya dengan arah 5' ke 3'. DNA polymerase mengkatalisis reaksi sehingga dNTP ditambahkan pada ujung 3' primer. Keberadaan ion magnesium menstimulasi aktifitas DNA polymerase dalam pembentukan ikatan fosfodiester antara 3'-OH dari deoksiribosa nukleotida paling akhir dengan 5'-dNTP. Aktivitas DNA polymerase berlangsung terus menerus sehingga terbentuk untai DNA baru yang urutannya sesuai dengan urutan DNA target (templat). Rantai DNA spesifik ini disebut produk amplifikasi. Pada akhir siklus pertama, jumlah DNA target menjadi dua kali lipat dari semula. Produk amplifikasi pada

setiap akhir siklus menjadi templat untuk siklus selanjutnya sehingga produk amplifikasi akan bertambah secara eksponensial.

Melalui teknik PCR identifikasi suatu mikroorganisme dari suatu sampel dalam waktu yang singkat dengan hasil yang akurat. Keakuratan ini berdasarkan spesifitas dan sensitivitas dari PCR yang tinggi, meskipun jumlah sampel sedikit yang pada teknik kultur dan serologi sering terhambat (Song *et al.*, 1993). Berdasarkan jenis dan kegunaannya dikenal beberapa macam PCR antara lain *Multiplex PCR*, *Quantitative Comparative-PCR* (QC-PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR* (RFLP-PCR), *Nested PCR*. *Nested PCR*, adalah jenis PCR yang menggunakan dua amplifikasi secara terpisah dengan dua set primer. Set primer yang pertama digunakan untuk mengamplifikasi untai DNA target dan pada amplifikasi kedua, set primer kedua untuk mengamplifikasi produk amplifikasi pertama.

3. Deteksi *Salmonella typhi* dengan PCR

Spesifitas PCR terletak pada primer yang digunakan. Hasil penelitian Hashimoto *et al.* 1995, menjelaskan bahwa aplikasi nested PCR dapat dikerjakan berdasarkan pada urutan DNA yang mengkode antigen Vi yang disebut region *ViaB*. Seperangkat primer nested PCR dirancang berdasarkan urutan region *ViaB* ini. Haque *et al.* 1999 melaporkan bahwa kelemahan metode ini adalah dapat memberikan hasil positif palsu karena keberadaan *S. Paratyphi C*. Penelitian yang dilakukan Song *et al.*, 1993 melaporkan bahwa pada region VI gen flagelin terdapat urutan nukleotida

yang spesifik sehingga dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi *S. typhi*. Haque *et al.*, 2001 melaporkan bahwa berdasarkan region VI gen flagelin spesifitas PCR dalam mendeteksi *S. typhi* mencapai 100%. Pengujian pada Nested PCR dilakukan dua kali amplifikasi. Pasangan primer yang digunakan pada amplifikasi pertama adalah ST1 dan ST2 dan nantinya akan menghasilkan produk amplifikasi berukuran 458 pasangan basa (pb). Pada amplifikasi kedua, primer yang digunakan adalah ST3 dan ST4 dan akan diperoleh produk amplifikasi yang lebih spesifik dan berukuran lebih pendek (343pb). Evaluasi mengenai hasil dari pengujian nested PCR telah dilakukan oleh Prakash *et al.*, 2005 dan menyarankan agar nested PCR dijadikan sebagai *Gold standard*.

4. Isolasi DNA dengan teknik Boom

Isolasi DNA merupakan proses yang sangat menentukan identifikasi DNA Sampel yang akan diamati. Perangkat terutama laboratorium yang memenuhi syarat sangat dibutuhkan untuk melakukan proses osolasi DNA, tergantung spesimen yang akan diekstraksi. Saat ini cara atau metode baku juga zat dan *reagen* sudah tersedia dalam bentuk siap pakai. Hal ini tentunya akan mempermudah dalam mengisolasi dan menentukan konsentrasi DNA sampel yang diperiksa (Hatta, 2001).

DNA dapat diisolasi untuk tujuan dan diagnostik tertentu. Sampel dapat berubah darah, semen, cairan vagina dan akar rambut (Kendrew, 1994). Berbagai macam teknik dapat dilakukan untuk mengisolasi DNA. Salah satunya dengan menggunakan teknik Boom yang diperkenalkan

oleh Boom *et al.*, 1990. Melalui teknik ini DNA maupun RNA sampel yang dianalisa dapat diekstraksi dan dimurnikan. Kelebihan teknik ini adalah sampel yang digunakan dalam jumlah yang kecil dan membutuhkan waktu ekstraksi yang tidak lama. Dalam teknik Boom digunakan agen *Chaotropic* yaitu *Guanidium thiocyanate* (GuSCN) bersama dengan *celite diatomeae* yang dapat mengikat DNA (Boom *et al.*, 1990, Hatta, 2001).

D. Antibiotik

1. Pengertian

Menurut Turpin dan Velu (1957) dalam Wattimena dkk., 1987, antibiotik adalah semua senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup atau diperoleh melalui sintesis yang memiliki indeks kemoterapi tinggi, manifestasi aktifitasnya terjadi pada dosis yang sangat rendah secara spesifik melalui inhibisi proses vital tertentu pada virus, mikroorganisme ataupun juga berbagai organisme bersel majemuk.

Hal yang sama juga didefinisikan oleh Russel, 2004 bahwa istilah antibiotik berasal dari kata *antibiosis* yang berarti melawan kehidupan. Awalnya antibiotik selalu dikatakan bahan organik dari mikroorganisme yang sifatnya toksik bagi mikroorganisme lain. Belakangan antibiotik merupakan refleksi dari kelompok mikroorganisme yang antagonis terhadapnya.

Dengan demikian, antibiotik dapat didefinisikan sebagai agen kimia, obat atau bahan/substansi yang dapat mengurangi atau mengeliminasi pertumbuhan mikroorganisme. Antibiotik dicirikan dengan spesifikasi

target atau organisme. Contoh antibiotik dapat berupa obat antivirus, obat antibakteri dan obat anti jamur. Antibiotik dapat berasal dari mikroorganisme, melalui proses sintesis atau semi sintesis.

2. Pengelompokan antibiotik

Berdasarkan pendekatan kimia, antibiotik dibedakan atas sembilan kelompok yaitu β -laktam (Penisilin dan Sefalopirin), Aminoglikosida, kloramfenikol, tetrasiklin, makrolida, rofampisin, polipeptida siklik, antibiotik polien dan antibiotik lain (Wattimena dkk., 1987). Berdasarkan mekanisme kerja, antibiotik terbagi atas beberapa kelompok yaitu: 1. yang mengganggu metabolisme sel mikroba, 2. yang menghambat sintesis dinding sel mikroba, 3. yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, 4. yang menghambat sintesis protein sel mikroba, dan 5. yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (Ganiswara dkk., 1995). Berdasarkan manfaat dan sasaran kerja antibiotik ada yang cenderung memiliki spektrum kerja sempit, bermanfaat terhadap kokus gram positif dan basil. Antibiotik jenis berikutnya adalah yang memiliki spektrum kerja yang luas, bermanfaat terhadap kokus gram positif dan basil gram negatif (Wattimena dkk., 1987). Penggunaan antibiotik untuk terapi harus berdasarkan pertimbangan khusus tidak hanya pengetahuan sifat kimia, mekanisme kerja, spektrum ataupun daya kerja. Pengetahuan karakteristik fenomena infeksi, lokasi infeksi, pengenalan penyebab infeksi, kondisi patologik penderita dan pengetahuan menyeluruh tentang antibiotik yang tersedia.

3. Penggunaan antibiotik dalam terapi

Pada dasarnya suatu infeksi lazimnya dapat ditangani secara berhasil oleh sistem pertahanan tubuh secara alami. Namun adakalanya perlu ditunjang oleh penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik untuk terapi harus berdasarkan pertimbangan khusus menuju penggunaan antibiotik secara rasional. Seleksi suatu antibiotik tidak hanya atas dasar pengetahuan sifat kimia, mekanisme kerja, spektrum aktifitas maupun daya kerjanya.

Ringkasnya, strategi terapi dengan antibiotik ditentukan oleh karakteristik fenomena infeksi, lokasi infeksi, pengenalan penyebab infeksi, kondisi patologik penderita dan pengetahuan menyeluruh tentang antibiotik yang tersedia dalam terapi (Wattimena dkk, 1987).

4. Jenis-jenis antibiotik dalam terapi demam tifoid

a. Kloramfenikol

Kloramfenikol merupakan antibiotik dengan spektrum luas yang berasal dari beberapa jenis *Streptomyces*, misalnya *S. Venezuela*, *S. omyamensis* dan *S. phaeochromogenes var chloromyceticus*. Kloramfenikol pertama kali diisolasi oleh Burkholder pada tahun 1974 dari *S. venezuelae*. Setelah para ahli berhasil menguraikan strukturnya maka sejak tahun 1950 kloramfenikol telah dapat disintesis secara total (Wattimenna dkk, 1987).

Pada mikroorganisme yang dianggap peka dapat dihambat pada 15.5 µg/ml atau kurang. Sekitar 95% strain bakteri Gram negatif secara in Vitro diinhibisi dengan 6.3 µg/ml kloramfenikol termasuk *S. typhi* (Wattimena, dkk., 1987). Kloramfenikol bekerja terhadap bakteri intra maupun ekstraseluler secara bakterostatik. Pada konsentrasi tinggi kadang-kadang bersifat bakterisidik terhadap bakteri tertentu (Mandal *et al.*, 2004).

Mekanisme kerja antibiotik ini berupa penghambatan sintesis protein bakteri. Kloramfenikol menghambat enzim peptidil transferase yang berperan sebagai katalisator untuk membentuk ikatan-ikatan peptida pada proses sintesis protein bakteri. Pembentukan ikatan peptida akan terus dihambat selama obat tetap terikat pada ribosom. Antibiotik ini berikatan dengan subunit 50S dari ribosom dan akan mempengaruhi pengikatan asam amino yang baru pada rantai peptida karena kloramfenikol menghambat peptidil transferase.

b. Penisilin

Penisilin memiliki berbagai kelompok dengan kelompok yang beragam tetapi umumnya diakhiri dengan akhiran *Cillin*. Antibiotik tersebut merupakan kelompok yang mengandung beta-laktam yang memiliki cincin inti *6-animopenicillanic acid* (lactam dan thiazolidine) dan cincin tepi. Kelompok penisilin meliputi; Penicillin G, Penicillin V, Oxacillin (dicloxacillin), Methicillin, Nafcillin, Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicilin, Piperacillin, Mezlocillin dan Ticarcillin (Etebu dan Ariekpar, 2016).

Penisilin membunuh bakteri dengan menghambat pembentukan transpeptidase yang menghubungkan peptidoglikan dinding sel. Hal ini menyebabkan dinding sel pecah sehingga sel mengalami lisis (Adzitey, 2015).

Penisilin mengikat pada *penicillin-binding proteins* (PBPs) yang merupakan enzim (transpeptidase, carboxypeptidase, dan endopeptidase) yang berperan dalam pembentukan dan mempertahankan struktur dinding sel. Dinding sel terdiri atas peptidoglycan, atau murein yang merupakan komponen polimerik yang terdiri atas rantai panjang polisakarida N-acetylglucosamin dan asam N-acetylmuramik yang terhubung oleh ikatan peptida yang pendek. Lambert, 2004 menjelaskan bahwa pembentukan peptidoglikan dapat dibagi menjadi tiga tahap, pembentukan prekursor di sitoplasma, menghubungkan produk prekursor menjadi rantai polimer panjang dan akhirnya menghubungkan antar peptidoglikan melalui transpeptidasi. Pada tahap transpeptidasi itulah penisilin menghambat dengan cara berperan sebagai struktur analog dari acyl-D-alanyl-D-alanine (substrat enzim) dan mengkatalisasi dan mengasilasi enzim transpeptidase. Pada akhirnya struktur peptidoglikan akan melemah dan mengarah pada kematian sel.

c. Sefalosporin

Sefalosporin merupakan antibiotik golongan beta-laktam yang strukturnya mirip dengan penisilin. Sefalosporin dibagi beberapa generasi yaitu generasi pertama hingga generasi kelima. Setiap generasi memiliki

spektrum yang lebih luas dari generasi sebelumnya (Etebu and Erikekpar, 2016)

Aksi kerja sefalosporin sama dengan golongan beta-laktam lainnya yaitu menghambat sintesis dinding sel tahap akhir, tepatnya menghambat transpeptidase atau *penicillin-binding proteins* (PBPs) yang berperan dalam biosintesis terakhir peptidoglycan. Resistensi terhadap beta - laktam umumnya disebabkan oleh beta-laktamase atau karena mutasi pada BPS sehingga mengakibatkan berkurangnya afinitas BPS (Smith, 2004).

d. Aminoglikosida

Aminoglikosida aktif dan efektif untuk melawan bakteri gram negatif. Antibiotik ini juga efektif jika dikombinasikan dengan antibiotik yang lain yang memiliki spektrum kerja yang luas. Ada tiga mekanisme bakteri menjadi resisten terhadap aminoglikosida, yaitu Mengurangi *uptake* atau permeabilitas sel, mengubah titik pengikatan pada ribosom atau melakukan modifikasi enzim.

Aminoglikosida bekerja dengan mengikat pada sub unit ribosom 30s yang dapat menghambat translasi protein. Resistensi salmonella terhadap aminoglikosida terjadi karena modifikasi yang melawan aminoglikosida. Menurut Shaw *et al.* 1993, enzim tersebut dikategorikan menjadi tiga grup yang dinamakan berdasarkan reaksi yang ditunjukkan meliputi; asetiltransferase, fosfotransferase, dan nukleotidatransferase yang bekerja dengan memodifikasi dan menginaktifkan aminoglikosida.

Asetiltransferase menyebabkan resistensi pada tobramisin, gentamisin dan kanamisin yang dikode oleh gen *aac*. Asetiltransferase berperan dalam mengkatalisis acetyl ko-enzim A dengan asetilasi pada gugus amino. Sedangkan pada fosfotransferase yang dapat menyebabkan resistensi pada kanamisin dan neomisin dikode oleh gen *aph* yang juga memiliki nama lain yaitu *strA* dan *strB* yang resisten terhadap streptomisin. Fosfotransferase berperan mengkatalisis ATP dengan fosforilasi pada grup hidroksil. Nukleotidtransferase diketahui menyebabkan resisten terhadap gentamisin, tobramisin, dan streptomisin.

e. Trimetoprim dan sulfonamid

Kelas antibiotik Trimetoprim dan sulfonamid merupakan antibiotik yang bersifat bakteriostatik dengan modus aksi mempengaruhi metabolisme folat melalui penghambatan kompetitif biosintesis asam tetrahydrofolat. Sulfonamida menghambat *dihydropteroate synthetase* (DHPS), sementara Trimetoprim menghambat *dyhydrofolate reductase* (DFHR) (Mascaretti, 2003).

Aktivitas antimikroba kombinasi antara trimethoprim dan sulfamethoxazole adalah hasil dari aksi 2 (dua) tahap jalur enzimatik *tetrahydro-folic acid*. Sulfonamida menghambat inkorporasi para-aminobenzoic acid (PABA) menjadi asam folat (*folic acid*), dan trimethoprim mencegah reduksi dihydrofolate menjadi tetrahydrofolate. Tetrahydrofolat penting dalam reaksi pemindahan 1-karbon (Petri, 2006). Dengan kata

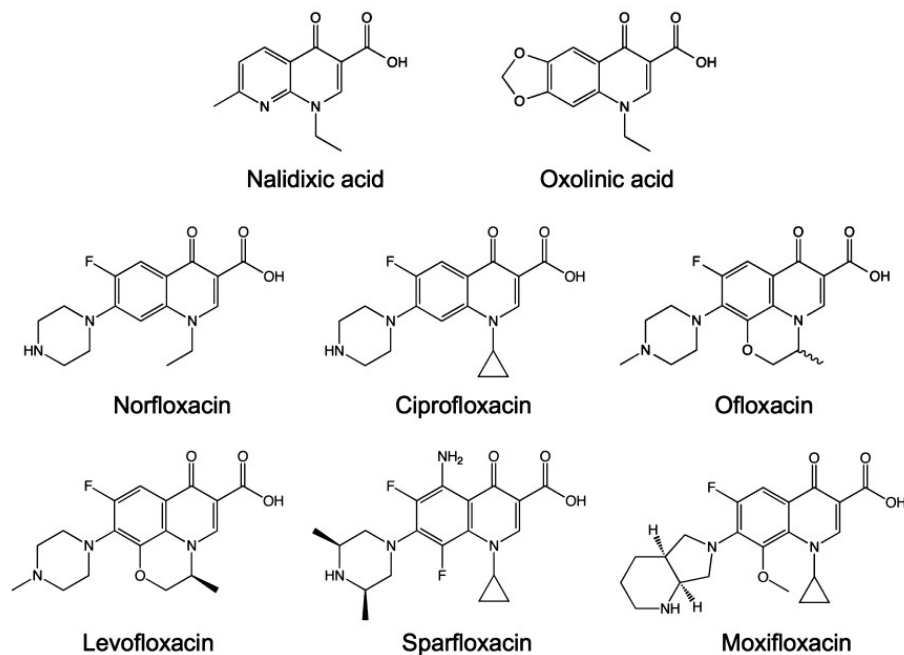
lain, transformasi 1 – karbon memerlukan kofaktor utama yaitu asam folat. Penghambatan asam folat ini akan menghambat pertumbuhan bakteri.

Resistensi *Salmonella* terhadap sulfanomida terkait dengan keberadaan gen *sul* ekstra yang mengekspresikan insensitifitas dari DHPS. Ada tiga gen utama *sul* 1, *sul* 2 dan *sul* 3 telah teridentifikasi. Gen *sul* 1 terkait dengan adanya integrin kelas I dan dibawa oleh *Salmonella* serotypes seperti *Enteritidis*, *Hadar*, *Heidelberg*, *Orion*, *Rissen*, *Agona*, *Albany*, *Derby*, *Djugu*, dan *Typhimurium*. Keberadaan gen *sul* 2 terkait dengan plasmid yang tidak terkait dengan integron kelas I dan ditemukan di *Salmonella* serotypes *Enteritidis*, *Agona*, dan *Typhimurium* (Chen *et al.*, 2004). Gen *sul* 3 diasosiasikan dengan plasmid dan integron kelas I pada *Salmonella* serotype *Anatum*, *Bradenburg*, *Heidelberg*, *Rissen*, *Agona* and *Typhimurium*.

f. Quinolon

Ada beberapa generasi quinolon yang diketahui efektif untuk melawan infeksi bakteri. Modus aksi antibiotik ini beragam dan terakhir dilaporkan target quinolon berkisar pada DNA girase dan topoisomerase IV (Mascerratti, 2003). Kelompok antibiotik quinolon yaitu nalidixic acid (naphthyridine) diisolasi pertamakali oleh George Lesher dkk pada tahun 1962 sebagai sintesis chloroquine. Nalidixic acid diperkenalkan pertama kali di klinik pada tahun pada kasus infeksi oleh bakteri enterik. Pada tahun 1980an senyawa generasi kedua dikembangkan dan menghasilkan norfloxacin, ciprofloxacin, dan ofloxacin. Semuanya menunjukkan

kemampuan terhadap enzim gyrase. Adanya penambahan fluorine pada karbon C6 menyebabkan quinolon biasa disebut “fluoroquinolon” (Gambar 7) (Aldred, *et al.* 2014).



Gambar 7. Struktur Quinolon. Nalidixic acid and oxolinic acid merupakan generasi Quinolon pertama Norfloxacin, ciprofloxacin, dan ofloxacin merupakan generasi Quinolon kedua dan Levofloxacin, sparfloxacin, dan moxifloxacin merupakan generasi Quinolon terbaru (Aldred, *et al.* 2014).

Mekanisme aksi quinolon diketahui kompleks dan sangat komprehensif. Quinolon membunuh bakteri dengan mengikat pada enzim untuk membersihkan titik aktivasi ligase. Antibiotik ini akan berinteraksi dengan protein dan berinterkalasi ke dalam DNA dan akan memecah untai ganda DNA. Dengan demikian, kestabilan garpu replikasi ataupun kompleks transkripsi oleh gyrase atau topoisomerase IV akan terganggu dengan antibiotik ini karena akan memicu fragmentasi kromosom secara

permanen. Fragmentasi DNA ini akan memicu respon darurat perbaikan DNA, dan jika terjadi terus menerus akan mengakibatkan kematian sel (Aldred, *et al.* 2014).

5. Antibiotik untuk terapi tifoid

Penisilin (amoksilin dan ampisilin), cephalosporin (cetrixone dan cefuroxime), aminoglycosida (streptomycin dan gentamycin), macrolide (eritromycin), fluoroquinolon (ciprofloxacin, ofloxacin dan perfloxacin) dan tetracycline merupakan antibiotik yang sering diberikan untuk mengobati infeksi *S. typhi*. Berdasarkan Pedoman Pengendalian Demam Tifoid, 2006, antimikroba segera diberikan bila diagnosis telah dibuat dan antimikroba yang diberikan sebagai terapi awal adalah dari kelompok antimikroba lini pertama untuk tifoid. Pilihan ini sesuai dengan antimikroba dengan kepekaan tertinggi suatu daerah, mengingat lain daerah berarti lain pula tingkat kepekaan antimikrobanya. Sampai saat ini kloramfetikol masih menjadi pilihan pertama. Berdasarkan efikasi dan harga. Kekurangannya adalah jangka waktu pemberiannya yang lama, serta cukup sering menimbulkan karier. Adapun antimikroba lini pertama untuk tifoid adalah: Kloramfenikol, Ampisilin atau Amoxicilin, Trimetroprim-Sulfametoksazol. Jika pemberian antimikroba lini pertama dinilai tidak efektif, dapat diganti dengan antimikroba lain atau dipilih antimikroba lini kedua. Antimikroba lini kedua meliputi Seftriakson, Cefixim dan Quinolon. Bila penderita dengan riwayat pernah mendapat tifoid serta memiliki

predisposisi untuk *carier*, maka pengobatan pertama adalah golongan quinolon (KMK, 2006).

Menurut *Indonesian Society of Tropical and Infectious Diseases Consultant Consensus 2010* mengenai demam tifoid, antibiotik yang digunakan untuk penanganan demam tifoid adalah Kloramfenikol, Ampisilin, atau -Sulfametoksazol (R H Saragih and G C F Purba, 2018). WHO, 2011 merekomendasikan hal serupa bahwa daerah yang bakteri *S typhi* masih sensitif, hendaknya menggunakan antibiotik lini pertama. Dari beberapa jenis antibiotik tersebut, terdapat beberapa yang diketahui telah resisten terhadap salmonella.

6. Penetapan Potensi Antibiotik

Kultur mikroba diisolasi dari penderita sebagai konfirmasi diagnosa dan membantu membuat keputusan mengenai terapi antibiotik dapat diketahui dengan menetapkan potensi aktifitas antibiotik secara *in vitro*. Dalam Farmakope Indonesia (Wattimena dkk., 1987) dijelaskan bahwa potensi adalah perbandingan dosis sediaan uji dengan dosis larutan standar.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba yaitu (1) pH lingkungan. Beberapa obat diketahui lebih aktif pada pH Asam (misalnya nitrofurantoin) sedangkan beberapa antibiotik yang lain lebih aktif pada pH alkalin, misalnya aminoglycosides dan sulfonamides. (2) Kandungan medium. Diketahui komponen medium seperti *Sodium polyanetholsulfonate* pada media kultur darah dan detergen anionic

ternyata menghambat aminoglycosida. PABA pada ekstrak jaringan antagonis dengan sulfonamida. (3) Kestabilan obat pada suhu inkubasi dimana beberapa antibiotik menjadi hilang aktivitasnya. (4) Ukuran inoculum menunjukkan bahwa semakin besar inoculum, semakin kecil penampakan kesensitivitan organisme. (5) masa inkubasi. Diketahui mikroba tidak mati karena terpapar antibiotik dalam waktu yang tidak lama. Semakin lama masa inkubasi dilakukan, semakin besar peluang mutan resisten untuk tumbuh. (6) aktivitas metabolik. Aktivitas antibiotik akan semakin baik pada saat bakteri memasuki fase pertumbuhan dibanding pada fase istirahat (Jawetz *et al.* 2013).

Penetapan kepekaan antibiotik dapat dilakukan dengan dua cara yaitu teknik difusi dan dilusi. Penetapan dengan teknik difusi agar atau disebut juga metode Kirby-Bauer yang menggunakan cakram kertas yang mengandung antibiotik. Cakram kertas yang mengandung antibiotik ini ditempatkan pada permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona yang terbentuk disekitar cakram diukur dan dijadikan ukuran kekuatan hambatan antibiotik. Penetapan dengan dilusi dilakukan dengan membuat dilusi antimikroba dengan konsentrasi yang diencerkan secara serial, baik dengan media padat maupun media cair. Bakteri kemudian di inokulasi pada media tersebut dan di inkubasi dalam jangka waktu dan suhu tertentu. Melalui cara ini, diperoleh konsentrasi hambat minimum atau *Minimum Inhibitory concentration* (MIC) yaitu konsentrasi terkecil

yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Uji dengan cara dilusi memerlukan waktu pengerjaan yang lama. Uji ini menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai.

E. Resistensi Antibiotik

1. Pengertian

Resistensi suatu mikroorganisme adalah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroorganisme oleh antibiotik tertentu (Ganiswara dkk., 1995). Resistensi antibiotik juga diartikan sebagai kemampuan bakteri untuk menghentikan penghambatan atau pematian oleh antibiotik dimana pada awalnya bakteri tersebut sensitif dan efektif. Resistensi didefinisikan sebagai tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya. Resistensi dapat diketahui melalui metode yang paling sederhana hingga molekuler. Salah satunya adalah dengan *disc diffusion* dimana Zona hambat yang terbentuk adalah konsentrasi minimum antibiotik yang cukup untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang diukur dengan satuan mm (mili meter). Diameter zona yang terbentuk akan diukur dan diinterpretasi berdasarkan Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, sebelumnya disebut the National Committee for Clinical Laboratory Standards or NCCLS) (Jorgensen dan Ferraro, 2009).

Multiple drugs resistance didefinisikan sebagai resistensi terhadap dua atau lebih obat maupun klasifikasi obat. Sedangkan *cross resistance*

adalah resistensi suatu obat yang juga berarti resistensi dengan obat lain yang belum pernah dipaparkan. Ini umumnya terjadi pada obat yang memiliki struktur kimia dan mekanisme kerja yang sama (Tripathi, 2003).

Forbes *et al.*, 2002 dalam Abatcha *et al.* 2014, menjelaskan bahwa resistensi instrinsik pada suatu organisme dapat terjadi karena adanya perubahan genetik atau terjadi secara alami. Sifat genetik dapat menyebabkan suatu mikroba sejak awal resisten terhadap antibiotik tertentu. Berdasarkan lokasi elemen genetik untuk resistensi dikenal resistensi kromosomal dan resistensi ekstrakromosomal. Perubahan sifat genetik terjadi karena mikroba memperoleh elemen genetik yang membawa sifat resistensi. Kondisi demikian disebut resistensi didapat (*Acquired resistance*). Jika elemen resistensi didapat dari luar maka disebut resistensi dipindahkan (*transferred resistance*). Jika terjadi akibat mutasi spontan atau akibat rangsang antimikroba disebut resistensi yang diinduksi (*induced resistance*).

2. Pola Resistensi

Beberapa pendekatan digunakan untuk klasifikasi antibiotik antara lain pendekatan kimia, berdasarkan mekanisme kerja, berdasarkan manfaat dan sasaran kerja antibiotik dan pendekatan berdasarkan daya kerja.

Berdasarkan pendekatan kimia, antibiotik dibedakan atas Sembilan kelompok yaitu β -Laktam (Penisilin dan Sefalosporin), Aminoglikosida, Kloramfenikol, Tetrasiklin, Makrolida, Rifampisin, Polipeptida Siklik,

Antibiotik Polien dan Antibiotik lain (Watimena dkk., 1987). 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 dan (5) antibiotik yang menghambat sintesis atau merusak asal nukleat mikroba (Ganiswara dkk, 1995) (tabel 1.)

Tabel 1 : Mekanisme Resistensi terhadap antimikroba (Neu HC, Gootz TD. 1996)

Antimicrobial class	Mechanism of resistance
Target modification	
Aminoglycosides	Altered ribosomal protein
β -lactam antibiotics	Altered or new penicillin-binding proteins
Erythromycin, clindamycin and Streptogramin B	Methylation of the bacteria ribosome producing resistance.
Quinolones	Alterations in DNA topoisomerase
Rifampin	Altered RNA polymerase
Sulfonamides	New drug-insensitive dihydropteroate synthase
Tetracycline	Ribosomal protection
Trimethoprim	New drug-insensitive dihydrofolate reductase
Vancomycin	Altered cell-wall precursors with decreased affinity
Detoxifying enzymes	
Aminoglycosides	Aminoglycoside-modifying enzymes: acetyltransferase, nucleotidyl-transferase, phosphotransferase
β -lactam antibiotics	β -lactamases
Chloramphenicol	Acetyltransferase
Trimethoprim-sulfamethoxazole	Resistant enzymes in folate-synthesis pathway
Decreased drug uptake	
Diminished permeability; β -lactam antibiotics, chloramphenicol, quinolone, tetracycline, trimethoprim	Alteration in outer-membrane proteins
Active efflux; erythromycin, tetracycline	New membrane transport system

Berdasarkan manfaat dan sasaran kerja, ada tiga kelompok antibiotik yaitu: (1) antibiotik yang cenderung memiliki spektrum kerja yang sempit, bermanfaat terhadap kokus Gram positif dan basil; (2) antibiotik yang secara relatif memiliki spektrum kerja yang luas; bermanfaat terhadap kokus Gram positif dan basil Gram negatif (Watimena dkk., 1987). Dari

segi daya kerjanya, antibiotik dapat dibedakan dalam kelompok antibiotik bakteristatik dan bakteriosidik. Kelompok pertama menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri. Kelompok kedua bekerja mematikan bakteri. Daya kerja keduanya berkaitan dengan mekanisme kerja antibakteri tersebut.

Mikroorganisme diketahui membangun mekanisme resistensi dengan cara mutasi pada lokasi gen protein-protein target atau dengan membawa elemen genetik yang mobil yang mengandung gen resisten seperti plasmid, integron dan transposon (Walsh, 2003 dalam Abatcha *et al*, 2014).

3. Resistensi Genetik

Bakteri dapat memperoleh sifat resistensi terhadap antibiotik dengan cara perpindahan secara vertikal dan perpindahan secara horizontal. Pada transmisi vertikal, bakteri memperoleh resistensi selama proses alami replikasi genom. Hal ini terjadi karena kesalahan-kesalahan pada genomnya selama proses replikasi. Kesalahan genom tersebut dinamakan mutasi. Dengan demikian, mutasi ini dapat berlangsung spontan dan acak. Mutasi menyebabkan gen mikroba berubah sehingga mikroba yang awalnya sensitif terhadap suatu antimikroba menjadi resisten.

Perpindahan gen secara horizontal difasilitasi dan tergantung dengan elemen genetik yang dinamis. Proses ini difasilitasi oleh plasmid, *transducion phage*, elemen *transporable*, integron dan *gene cassette*. Elemen *transporable* terdiri dari beberapa jenis, dimana *insertion*

sequence dan transposon merupakan dua hal utama yang selalu dikaitkan dengan resistensi.

Resistensi dipindahkan (*transferred resistance*) berarti mikroba berubah menjadi resisten akibat memperoleh suatu elemen pembawa faktor resisten. Faktor ini dapat diperoleh dengan cara transformasi, transduksi atau dengan cara konyugasi (gambar 8). Pada transformasi, mikroba menginkorporasi faktor resistensi langsung dari media sekitarnya. Pada transduksi, faktor resistensi dipindahkan dari mikroba resisten ke mikroba yang sensitif dengan perantaraan bakterifag. Cara konyugasi merupakan cara pemindahan faktor. Faktor resistensi yang dipindahkan berupa plasmid. Tetapi, tidak semua plasmid dapat dipindahkan. Plasmid yang dapat dipindahkan adalah plasmid faktor R atau disebut juga plasmid penular (*infectious Plasmid*). Faktor R membawa sifat resistensi pada beberapa antibiotik dan ditularkan terutama sesama enterobakteria termasuk salmonella.

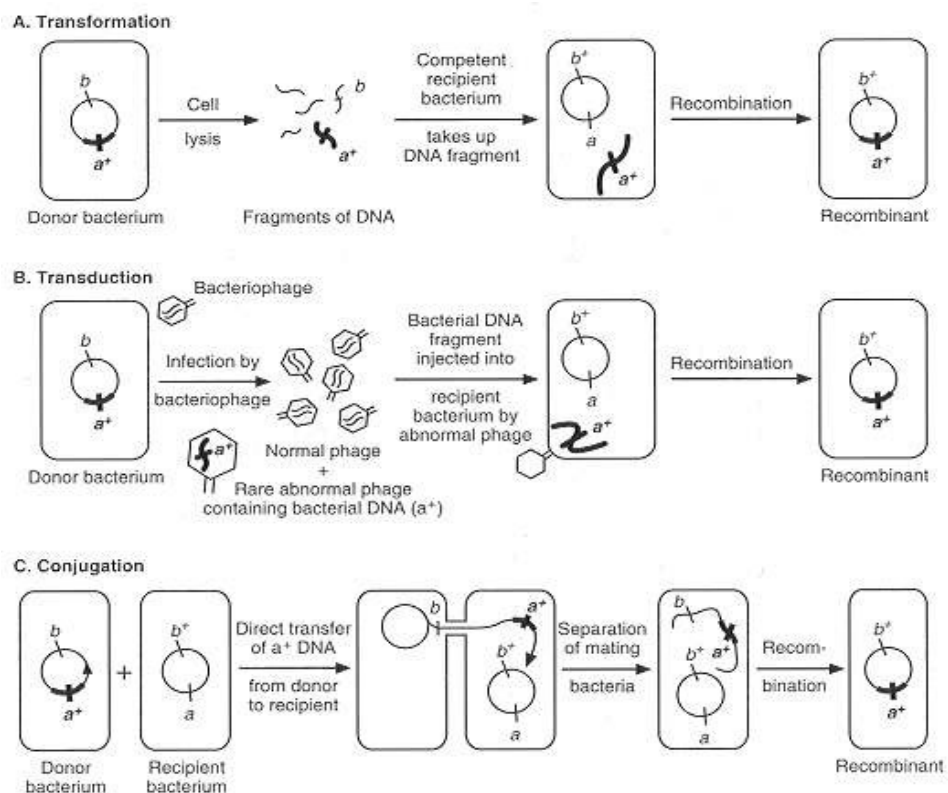
Plasmid adalah DNA sirkuler kecil yang terdapat pada bakteri yang terdiri dari 3000 hingga 25.000 pasangan basa. Elemen genetik ekstrakromosom ini dapat mengadakan replikasi secara otonom di dalam sel inang (Scheleif, 1986). Berdasarkan fungsinya plasmid terbagi menjadi beberapa yaitu; Plasmid F (plasmid fertilitas), plasmid yang menyebabkan munculnya fenotip tertentu. Plasmid degradatif, plasmid yang mengkode sintesa enzim-enzim katabolik. Plasmid virulensi, plasmid yang meningkatkan patogenitas bakteri dengan cara mengkode senyawa

tertentu. Plasmid R (Plasmid Resistensi), plasmid yang mengandung gen penyebab resistensi terhadap antibiotik (Praseno, 1989).

Resistensi dengan perantaraan transposon merupakan hal penyebab suatu bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik. Bila transposon yang mengandung gen resisten mengadakan insersi pada plasmid maka sifat resisten tersebut akan dapat dipindahkan ke sel lain. Pada sel itu sendiri, plasmid akan bereplikasi atau mengadakan insersi pada kromosom dan sel ini menjadi resisten terhadap antibiotik. Transposon adalah urutan segmen DNA yang dapat berpindah posisi di genom yang sama dalam satu sel. Perpindahan ini sering juga disebut dengan transposisi dan proses ini menyebabkan mutasi. Transposon (Tn) juga biasa disebut sebagai *jumping genes*, dan merupakan salah satu contoh dari elemen genetik bergerak (*Mobile Genetic Elements*). *Insertion sequence* = IS (*simple transposon*) adalah elemen DNA yang bersifat *mobile* pada bakteri, biasanya mengandung gen transposase. Struktur ini dapat mengubah urutan DNANYa sendiri dengan memotong dari lokasi DNA dan pindah ke tempat lain. Akibatnya IS menyebabkan susunan genom berubah, terjadi delesi, inversi, duplikasi dan fusi replikasi.

Transposisi mempunyai peranan dalam proses evolusi beberapa plasmid bakteri. Sebagai contoh, integrasi plasmid F yang berasal dari *E. coli* ke dalam kromosom bakteri seringkali terjadi melalui proses rekombinasi antara suatu transposon yang ada di dalam plasmid dengan transposon yang homolog di dalam kromosom bakteri.

Pada masa kini, transposon dianggap sebagai relik (peninggalan) evolusi dari masa lalu dan dianggap sebagai sisa-sisa virus yang telah terintegrasi ke dalam genom suatu organisme. Elemen genetik yang dapat bertransposisi ditemukan baik dalam prokaryot, eukaryot, maupun dalam bakteriofag. Semua transposon membawa kode genetik untuk satu atau lebih dari satu protein yang diperlukan untuk transposisi. Di samping itu, beberapa transposon juga membawa gen lain yang menghasilkan fenotipe tertentu, misalnya ketahanan terhadap antibiotik tertentu (Yuwono, 2005)



Gambar 8 :Transformasi, transduksi atau konyugasi pada bakteri (Neu HC, Gootz TD. 1996)

Berdasarkan mekanisme perpindahan (transposisi), transposon dapat di kelompokkan menjadi tiga kategori, yaitu transposon potong-

tempel (*cut-and-paste transposon*), transposon replikatif, dan retrotransposon. Transposon potong-tempel dapat berpindah dari satu lokus ke lokus lain dengan cara dipotong dari satu lokus pada kromosom dan ditempelkan pada lokus lain yang dapat terletak pada kromosom yang berbeda. Transposon replikatif (*replicative transposon*) mengalami transposisi dengan melibatkan proses replikasi elemen DNA transposon. Enzim transposase yang dikode oleh elemen genetik tersebut berperan di dalam proses interaksi dengan sisi tempat penyisipan transposon. Dalam interaksi tersebut, elemen DNA transposon direplikasi dan salah satu turunan (*copy*) disisipkan pada sisi baru, sedangkan elemen DNA aslinya tetap berada di sisi semula. Retrotransposon disebut juga jenis transposon kelas I yang dapat digambarkan sebagai *copy and paste*. Retrotransposon menyalin dirinya dalam dua tahap, pertama dari DNA ke RNA dengan transkripsi. Kemudian, dari RNA kembali ke DNA oleh transkripsi balik. Salinan DNA ini kemudian dimasukkan ke genom pada posisi baru. Transkripsi balik dikatalisis oleh enzim transkriptase yang sering dikodekan oleh transposon sendiri.

Insertion sequence element atau biasa juga disebut elemen IS adalah fragmen pendek DNA yang mengkode fungsi enzim untuk rekombinasi spesifik pada tempat-tempat tertentu dengan sekuens pengulangan inversi pada tiap-tiap ujungnya. Sekuens tersebut tidak berperan langsung pada timbulnya resistensi tetapi berfungsi sebagai

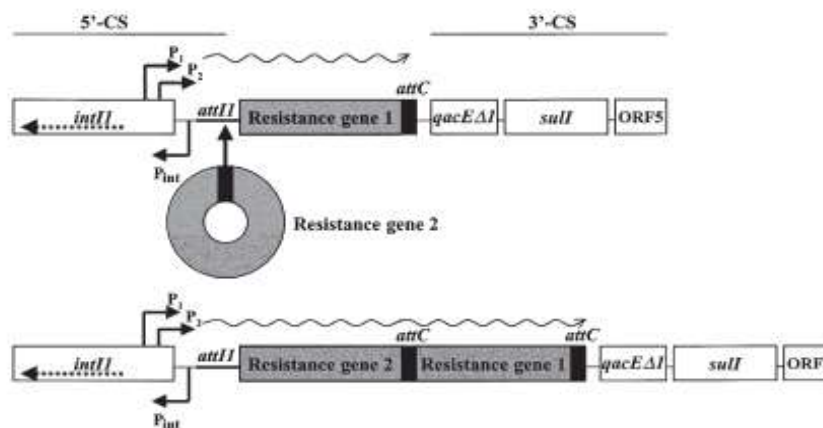
tempat terintegrasinya elemen yang menimbulkan resistensi seperti plasmid atau transposon.

Integron merupakan unit genetik yang tidak mobil dan tidak dapat menggandakan diri, tetapi dapat mengkode integrase dan menyediakan tempat spesifik untuk *gene cassettes*. *Gene cassette* adalah elemen pengkode penentu resistensi, umumnya tidak memiliki promotor dan dengan sekuens berulang secara *downstream*. Integron mengawali penangkapan *gene cassette* pada tempat yang sama sehingga menimbulkan kumpulan gen –gen resisten.

Integron merupakan sistem ekspresi gen yang menginkorporasi daerah *Open Reading Frame* (ORF) dan mengubahnya menjadi gen fungsional. Komponen esensial integrin meliputi gen integrase (*intl*), tempat *attachment* (*attI*) dan promotor yang nantinya akan memulai ekspresi gen apapun yang terintegrasi dan sesuai (Carattoli, 2001).

Sebuah integron biasanya ditentukan dengan keberadaan gen integrase (*intl*) dan *proximal primary recombination site* (*attI*). Urutan asam amino pada integrase *Intl* dijadikan dasar penentuan kelas integron (Yang *et al*, 2015). Ada empat kelas integron yang diketahui yang sejauh ini sering ditemukan pada isolat. Integron kelas 1 berarti membawa *intl1*, kelas 2 membawa *intl2*, kelas 3 membawa *intl3* dan kelas 4 dengan *intl4*. Integron yang paling prevalen pada hampir semua strain adalah integron kelas 1. Integron ini unik dan dicirikan dengan keberadaan dua sekuens yang tetap terjaga (*Conserved Sequence/CS*) 5' dan 3'. yang terdapat

region yang variabel di dalamnya. Komponen penting dari integron kelas 1 adalah gen integrase (*intI1*) dan tempat penempelan pada *gene cassette* (*attI*) dimana terdapat 5' CS. Adapun 3'-CS diidentifikasi dengan keberadaan gen resistensi sulphonamides (*sul1*), gen resisten (*qacEΔ1*), dan ORF5 dan ORF6 dengan fungsi yang belum diketahui. Integron kelas 1 dapat mengkode satu atau lebih *gene cassettes* pada region yang variabel (gambar 9.).



Gambar 9 : Presentasi skematik dari integron kelas 1 dan model akuisisi *gene cassette* (Carattoli, 2001)

4. **Multiple Drug Resistance Demam Tifoid (MDR DT) dan Resistensi GyrA**

Multidrug resistance demam tifoid (MDR DT), disefenisikan sebagai resistensi yang terjadi pada semua obat lini pertama antibiotik (ampisilin, co-trimoxazole, dan kloramfenikol). Kejadian MDR pada *S. typhi* ini pertama kali dilaporkan terjadi di China pada akhir tahun 1870an. Dua tahun berikutnya dilaporkan adanya strain *S. typhi* MDR di India, Pakistan

and Arab. Keberadaan plasmid INCHI1 yang membawa MDR ini terobservasi dan sekarang telah tersebar secara global (Phan and Wain, 2008).

Sifat resistensi terhadap antibiotik melibatkan perubahan genetik yang bersifat stabil dan diturunkan dari satu generasi ke generasi lainnya, dan setiap proses yang menghasilkan komposisi genetik bakteri seperti mutasi, transduksi (transfer DNA melalui bakteriofaga), transformasi (DNA berasal dari lingkungan) dan konjugasi (DNA berasal dari kontak langsung bakteri yang satu ke bakteri lain melalui pili) dapat menyebabkan timbulnya sifat resisten tersebut. Proses mutasi, transduksi dan transformasi merupakan mekanisme yang terutama berperan di dalam timbulnya resistensi antibiotik pada bakteri kokus Gram positif, sedangkan pada bakteri batang Gram negatif semua proses termasuk konjugasi bertanggung jawab dalam timbulnya resistensi (Sande, 1990). Persoalan yang muncul berikutnya adalah adanya resistensi terhadap satu atau lebih antibiotik atau antimikroba terutama antibiotik lini pertama (*Multi Drug Resistance*).

Pada tahun 1948, kloramfenikol ditemukan dan dilaporkan sangat efektif dan umum digunakan dalam mengobati demam tifoid. Hingga pada tahun 1972 strain *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol menjadi masalah yang besar. Olarte dan Emma (1973) melaporkan adanya *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol di Meksiko. Laporan ini kemudian dilaporkan pula oleh negara-negara lain yaitu India (1972),

Vietnam (1973) dan Korea (1977). Strain-strain tersebut dilaporkan juga resisten terhadap ampicilin. Penggunaan ko-trimoxazol efektif digunakan pada strain-strain yang resisten tersebut. Hingga pada tahun 1975 dilaporkan adanya resisten terhadap Co-trimoxazole di Prancis. Pada akhir 1980an, muncul strain *S. typhi* yang resisten terhadap tiga antibiotik tersebut.

Fluoroquinolon menjadi obat pilihan untuk mengatasi *Multidrug resistant* (MDR) secara luas. Timbulnya kasus-kasus MDR menjadikan fluoroquinolon merupakan antibiotik yang kemudian dapat mengobati demam tifoid. Antibiotik tersebut juga telah direkomendasikan oleh WHO sejak tahun 2003. Isolat *S. typhi* yang resisten terhadap fluoroquinolon yang disebabkan mutasi pada gen *gyrA* justru mengalami peningkatan secara internasional (Phan *et al.* 2016) walaupun sebenarnya sejak tahun 1992, telah dilaporkan adanya isolat *S. typhi* yang resisten terhadap Fluoroquinolon di Inggris. Kasus-kasus serupa juga dilaporkan dari beberapa negara termasuk India. Akhirnya generasi ketiga cephalosporin digunakan dan kemudian diikuti laporan resisten terhadap antibiotik tersebut (Ugboko and Nandita, 2014).

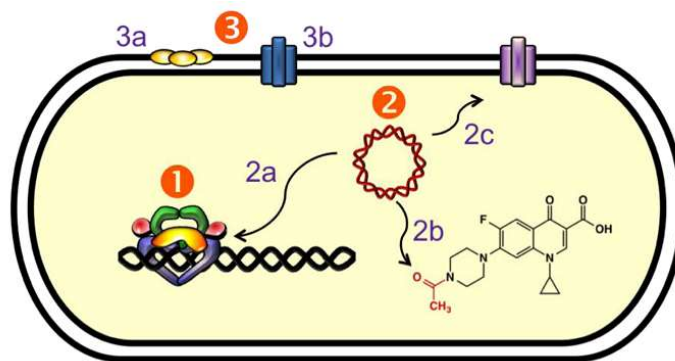
Target fluoroquinolono adalah subunit DNA gyrase yang dikode oleh gen *gyrA* dan *gyrB*, dan DNA topoisomerase IV gen *parC* dan *parE*. Mutasi yang terjadi terletak pada kodon 83 dan 87 pada gen *gyrA* dan dikaitkan dengan resistensi (Wain *et al.*, 1997). Mutasi pada *gyrA* umumnya melibatkan substitusi grup hidroksil dengan grup hidrofobik. Hal

ini menyebabkan perubahan konformasi sehingga fluoroquinolon tidak lagi mengikat (Smith, 2004).

Resistensi Salmonella terhadap antibiotik ini dikelompokkan menjadi dua mekanisme. Pertama, gen *gyrA* dan *gyrB* yang mengkode sub unit DNA girase akan menarget mutasi pada *Quinolone-Resistance-determining Region* (QRDR) dan *ParC* pada sub unit topoisomerase IV. Modus yang kedua adalah mengubah ekspresi *system efflux* AcrAB-TolC yang menyebabkan mutasi pada sistem gen regulasi (Levy *et al*, 2004 dan Olliver *et al*. 2005, Hooper and Jacoby, 2015). Indikasi berdasarkan penelitian oleh Hirose dkk, adalah mutasi pada *gyrA* merupakan hal yang penting mengapa terjadi resisten terhadap fluoroquinolon pada serovars Typhi and Paratyphi A. (Hirose, *et al*. 2002)

Mekanisme resistensi Quinolon dapat dilihat pada gambar 8, yaitu (1) Resistensi pada target, yaitu terjadinya mutasi pada *gyrase* and topoisomerase IV yang melemahkan interaksi enzim quinolon (2) Resistensi oleh plasmid, (2a) protein Qnr (kuning), protein yang dapat melemahkan ikatan topoisomerase pada DNA dan melindungi kompleks enzim DNA dari quinolon (2b) *Aac(6')-Ib-cr* yang merupakan aminoglycoside acetyltransferase yang mengasetilasi nitrogen bebas pada cincin karbon dari ciprofloxacin dan norfloxacin, sehingga efektifitas kedua obat tersebut menurun. (2c) Plasmid yang mengkode *efflux pumps* menurunkan konsentrasi quinolon dalam sel. (3) Resistensi pada kromosom. (3a) rendahnya ekspresi porin terutama pada Gram negatif

menyebabkan menurunnya pemasukan obat ke dalam (3b) Terlalu tingginya ekspresi kromosom yang mengkode *efflux pumps* menurunkan retensi obat dalam sel (Gambar 10) (Aldred, *et al.* 2014).



Gambar 10. Mekanisme resistensi Quinolon (Aldred, *et al.* 2014)

Mekanisme resistensi antibiotik *S. typhi* dimediasi oleh dua faktor yaitu akuisisi oleh gen asing melalui plasmid dan mutasi pada kromosom (Holt *et al.*, 2008). Plasmid yang mengkode resistensi kloramfenikol pertama kali dilaporkan pada awal 1970an dan diikuti epidemik yang meluas di Amerika. Pada penggunaan ampisilin ternyata juga dilaporkan adanya strain yang mengandung plasmid resisten terhadap ampisilin. Pada tahun 1980 diperkenalkan Ko-trimoxazol dan tidak berapa lama ditemukan plasmid resisten terhadap trimethoprim dan sulfonamida. Kasus pertama *Salmonella enteric serovar typhi* yang memiliki plasmid resisten terhadap ampisilin, kloramfenikol dan Ko-trimoxazol dilaporkan berasal dari Asia tenggara (Mirza *et al.*, 2000). Kebanyakan resistensi obat pada organisme mengalami perubahan genetik apakah akibat mutasi kromosom atau akuisisi plasmid atau transposon. Hal serupa juga

diuraikan dalam Phan and Wain, 2008 bahwa terdapat kestabilan plasmid IncHI1 pada *S. typhi* terkait perkembangan resistensi terhadap antibiotik. Laporan pertama mengenai isolat *S. typhi* yang membawa plasmid IncHI yang resisten terhadap Kloramfenikol, tetrasiklin, streptomisin, dan sulfaonamida ditemukan pada kejadian luar biasa di Kota Meksiko. Penemuan *S. typhi* membawa IncHI1 ditemukan berikutnya pada dua kejadian luar biasa di Vietnam dan India pada tahun yang sama. Pada semua plasmid yang ditemukan dari tiga kejadian luar biasa tersebut, memiliki grup IncHI1 dengan ukuran yang sama meskipun berbeda fenotip yang terkait dalam resistensi terhadap merkuri dan kemampuan menggunakan sitrat.

Akibat adanya penyebaran *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol maka terjadi perubahan terapi antibiotik dengan menggunakan ko-trimoxazol atau ampisilin di beberapa wilayah termasuk India dan Vietnam. Hal ini memunculkan *S. typhi Multiple Drug Resistant* (MDR) yang pertama kali dilaporkan pada tahun 1988 di Kashmir. Demam tifoid dengan *S. typhi* MDR juga dilaporkan terjadi di Mesir pada tahun yang sama, Shanghai pada tahun 1988-1989, di Qatar pada tahun 1988 dan Selatan India pada tahun 1989. Beberapa isolat dari wilayah-wilayah tersebut mengandung plasmid dengan berat molekuler yang tinggi yaitu 150kb hingga 185kb. Dengan demikian, *S. typhi* MDR telah menyebar secara global dan pada tahun 1998, plasmid *S. typhi* MDR dapat diisolasi dari seluruh dunia.

a. Resistensi akibat akuisisi plasmid

Plasmid merupakan molekul DNA yang kecil dan terpisah dari DNA kromosomal, sehingga kemudian disebut DNA ekstrakromosomal. Umumnya, bakteri menggunakan plasmid untuk beradaptasi dengan tekanan lingkungan dan plasmid diketahui memiliki kemampuan untuk bereplikasi secara independen. Resistensi strain bakteri terhadap antibiotik dapat terjadi karena adanya suatu gen yang terdapat di dalam plasmid. Plasmid ini berbentuk sirkuler dan dapat berpindah dari satu sel ke sel lain melalui mekanisme konjugasi. Sehingga plasmid dari strain bakteri yang diisolasi dari daerah yang sama dan dilakukan pada saat yang sama dapat menunjukkan karakteristik plasmid yang tidak berbeda (homogen). Hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian Thong *et al.*, 2000, yang menggunakan teknik *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) untuk menganalisis secara molekuler sensitivitas antibiotik dan *Salmonella typhi* MDR dari wilayah-wilayah endemik tifoid.

Berdasarkan kemiripan struktur pilus H, terdapat dua grup Inc pada H *incompatibility* complex, yaitu IncHI and IncHII. Semua plasmid IncH plasmids merupakan molekul berukuran besar dengan ukuran 150 kb atau lebih dan peka terhadap temperature untuk transfer konjugatif. Berdasarkan pada pemotongan dengan restriksi pada studi hibridisasi DNA dan *incompatibility*, grup plasmid IncHI dibagi menjadi tiga subgroup yaitu; IncHI1, IncHI2 and IncHI3. Meskipun grup-grup tersebut tidak

kompatibel satu sama lain, plasmid tersebut memiliki homologi minimal satu sama lain (Phan and Wain, 2008).

Plasmid dari *Enterobacteriaceae* dikategorikan menjadi dua grup berdasarkan kemampuan atau ketidakmampuan plasmid bersama dalam sel bakteri. Plasmid dengan grup inkompabilitas (Inc) yang sama merupakan plasmid yang terhubung erat, dengan mekanisme replikasi dan fungsi plasmid yang hampir sama. Plasmid tersebut dinamakan *incompatibility group* (Inc) HI1 yang merupakan vektor penting dalam resistensi antibiotik pada *S. typhi*. Plasmid IncHI1 kemudian dapat diisolasi dari strain *S.typhi* yang merupakan MDR. Mekanisme resistensi antibiotik melalui plasmid ini terjadi dengan: inaktivasi obat dan mengurangi permeabilitas membran, modifikasi titik target dan efflux antibiotik. Holt *et al.*, 2011 menyebutkan bahwa plasmid IncHI1 dapat pindah dari kelompok *Enterobacteriaceae* dan kelompok bakteri gram negatif lainnya. Di alam plasmid IncHI1 dideteksi pada isolat *Salmonella enteric* dan *Escherichia coli*.

Plasmid IncHI1 merupakan vektor penting dalam resistensi antibiotik pada *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *typhi* dan *S. Paratyphi A*. Pada *S. typhi*, plasmid IncHI1 diketahui muncul pada tahun 1970an dan menyebar secara global. Keberadaan plasmid ini terus terjaga dalam populasi bakteri meskipun tanpa adanya seleksi antibiotik (Phan and Wain, 2008).

Terdapat tiga plasmid yang telah diurut atau disekuensing urutan nukleotidanya secara lengkap, yaitu plasmid IncHI1 R27 (180kb), plasmid pHCM1 (218kb) (gambar 16) and pAKU1 (212 kb). Sherburne *et al.* 2000, dan Parkhill *et al.* 2001 melaporkan bahwa R27 yang merupakan prototipe dari plasmid IncHI1, telah diisolasi untuk pertama kalinya di UK dari bakteri *Salmonella Typhimurium* pada tahun 1961. Plasmid ini dinyatakan sangat mirip dengan plasmid yang terdapat pada plasmid yang ditemukan pada *S. typhi*. Plasmid pHCM1 berasal dari *S. typhi* yang ditemukan di Vietnam pada tahun 1993, pAKU1 dari *S. paratyphi* A dan strain AKU12601 dari Pakistan pada tahun 2002. Ketiga plasmid tersebut berbagi urutan dasar yang sama dimana lebih dari 99% identik pada tingkat DNA termasuk 83% urutan pAKU1. Hal ini menunjukkan adanya hubungan evolusi yang sangat dekat dan juga penyebaran plasmid MDR dalam serovar salmonella yang terbatas pada manusia ke manusia yang lain.

b. Resistensi kromosom

Resistensi yang disebabkan oleh kromosom terjadi karena mutasi pada gen yang menjadi target obat atau sistem transport membran yang mengontrol masuk dan keluarnya obat. Frekuensi mutasi spontan berkisar 10^{-7} hingga 10^{-9} , lebih rendah dari frekuensi akuisisi resistensi oleh plasmid. Resistensi terhadap fluoroquinolon dilaporkan disebabkan oleh mutasi titik pada gen *gyrA* yang mengkode enzim gyrase, tepatnya pada daerah QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*). Demikian pula

resistensi pada trimethoprim yang disebabkan mutasi gen kromosomal yang mengkode enzim dihydrofolate reductase. Resistensi terhadap sulfonamide disebabkan oleh mutasi gen kromosomal yang mengkode enzim dihydropteroate synthetase yang mengurangi afinitas ikatan pada obat (Ugboko and Nandita, 2014).

F. Evolusi *Salmonella typhi*

Salmonella berasal dari *Escherichia coli* sekitar 100 juta tahun yang lalu. Kromosom sirkuler *Salmonella* and *E. coli* secara genetik hampir sama dengan ukuran 4.5-5 juta pasangan basa dan mengkode sekitar 4,500 gen. Pada tingkat asam amino, kesamaannya mencapai 80%.

Akuisisi dari *genomic islands* yang dikenal dengan istilah *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI), merupakan hal penting dalam evolusi *Salmonella*. Terdapat SPI 1 baik pada *Salmonella bongori* and *S. enterica* tetapi tidak pada *E. coli*. Keberadaan ini konsisten oleh akuisisi tunggal dari nenek moyang yang sama pada semua turunan *Salmonella*. Keberadaan SPI 2 terdapat pada *S. enterica* tetapi tidak pada *S. bongori* menunjukkan adanya konsistensi asal *S. enterica* setelah keberadaan *S. bongori*.

Variasi gen untuk biosintesis antigen membuat pembagian setidaknya 1.500 serovar dan setiap serovar memiliki keragaman kromosom sebagai akibat mutasi titik, apakah karena penambahan atau kehilangan gen. Jadi, sekitar 90% serovar sama-sama membagi gennya dengan lebih dari 98% identitas nukleotida.

Seperti halnya penyakit Pes, kolera dan cacar air, demam tifoid merupakan salah satu penyakit infeksi klasik pada manusia. Penyakit demam tifoid ini tersebar melalui saluran cerna oral oleh makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh *Salmonella enterica serovar typhi* (Typhi). Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang diklasifikasikan sebagai serovar dari spesies *S. enterica*.

S. enterica merupakan spesies yang dikenal penyebab gastroenteritis pada hewan termasuk manusia. Hal yang berbeda menurut Parkhill, *et al.* 2001, adalah dibanding dengan serovar *S. enterica* yang lain, Typhi merupakan patogen yang terbatas hanya pada manusia yang menyebabkan infeksi sistemik (demam tifoid) dan infeksi kronik (karier asimtomatik). Sejumlah proses evolusi mengimplikasikan bagaimana adaptasi *Salmonella typhi* pada *niche* yang terspesialisasi ini termasuk akuisisi horizontal beberapa *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI) dan hilangnya fungsi gen secara ekstensif.

Typhi, bersama dengan patogen lain yang patogen terhadap manusia seperti *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis* dan *bacillus anthracis* merupakan organisme monoformik. Genom isolat Typhi sangat terjaga dan saling terkait secara klonal. Analisis filogenetik dari urutan DNA genom menunjukkan populasi *Salmonella typhi* secara global merupakan klonal dan berasal dari asal yang sama yang berpindah pada populasi manusia sejak ribuan tahun silam (Roumagnac, *et al.* 2006 dan Holt *et al.* 2008 dalam Wong, *et al.* 2015). Reeves *et al.* 1989 dalam Parkhill *et al.*,

2001 menyebutkan bahwa manusia merupakan satu-satunya inang *Salmonella typhi*. Bakteri ini terbatas bersifat patogen bagi hewan. Hasil analisis isoenzim menunjukkan isolat *S. typhi* di seluruh dunia memiliki hubungan kekerabatan satu sama lain.

Beberapa taksa bakteri dapat dikelompokkan dalam pembagian sub yang lebih beragam, kelompok klon (komplek klon atau ekotipe) sebagai hasil diferensiasi dari penggantian klonal, seleksi menyeluruh, seleksi periodik atau terjadinya pengurangan populasi secara drastis. Isolasi geografis dan penggantian klonal juga akan menyebabkan terjadinya perbedaan filogeografis pada bakteri patogen di seluruh dunia bahkan pada bakteri yang secara genetik baru merupakan patogen monomorfik seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Yersinia pestis*. *Salmonella typhi* merupakan bakteri yang secara genetik adalah monomorfik bakteri patogen yang terbatas pada manusia.

Genom *S. typhi* mencapai 4-5 juta pasang basa dan mengkode 4000 gen dimana lebih dari 200 diantaranya tidak berfungsi secara aktif. Kondisi genom ini hampir sama dengan genom bakteri enterik yang lain yang memiliki kromosom dengan ukuran 4.3-5.0 Mb. Beberapa strain yang berbeda memiliki DNA ekstrakromosomal yang disebut plasmid. Plasmid ini sering mengandung gen yang diasosiasikan dengan resistensi antibiotik dan virulensi (Baker and Dougan, 2007). Berdasarkan *S. typhi* yang diisolasi dari seluruh dunia mengindikasikan bahwa bakteri tersebut

berasal dari nenek moyang yang sama sekitar 30.000 hingga 50.000 tahun yang lalu.

Plasmid dengan ukuran yang besar seperti IncHI1 diyakini telah menginfeksi inang secara sesuai. Hasil penelitian di laboratorium menunjukkan adanya ko-evolusi pada bakteri yang membawa plasmid dengan nenek moyang bakteri yang tidak membawa plasmid menunjukkan adanya kesesuaian dan dapat sesuai dengan sel yang baru. Jika hal ini berlangsung dalam kondisi alami maka sekali plasmid konyugatif terdapat dalam populasi bakteri maka plasmid tersebut akan tetap ada meskipun seleksi alami (penggunaan antibiotik) ditiadakan. Lebih jauh lagi, akuisisi plasmid yang baru sebagaimana yang terdapat di *S. paratyphi* A, menunjukkan penyebaran plasmid terus terjadi.

Meskipun plasmid IncHI1 secara umum hanya terdapat pada *S. typhi*, berdasarkan transmisi termo-sensitif dan jarak kekerabatan yang luas, plasmid tersebut berasal dari bakteri tanah. Pola resistensi kloramfenikol yang merebak pada tahun 1972, merupakan akibat dari penyebaran plasmid IncHI1 secara global pada *S. typhi* dan diakuisisi oleh *S. paratyphi* A. Studi pencarian evolusi alami dari plasmid dengan fenotipik yang dominan dan hubungan antara bakteri yang cocok untuk resistensi antibiotik masih sangat sulit diketahui.

Pada era genomik sekarang ini, strain-strain dapat dikumpulkan dari berbagai negara-negara yang merupakan endemik resisten antibiotik dan dianalisis datanya melalui teknologi pengurutan atau sequencing dengan

454 dan Solexa. Melalui teknologi ini, hubungan antara gen yang dibawa oleh plasmid dengan bakteri yang sesuai dapat diwujudkan jika memang ada hubungan kekerabatannya.

Genom *Salmonella enterica* Serovar *typhi* yang telah dapat dilihat urutannya adalah strain CT18 dan Ty2. Strain CT18 memiliki genom dengan ukuran 4.809.037 bp termasuk gen resisten terhadap antibiotik. Pada genom ini terdapat lebih 200 pseudogen, 218,150 bp terkait gen MDR pada plasmid IncH (pHCM1) (tabel 2) (Parkhill *et al.* 2001). Sedangkan genom Ty2 mengandung 4.8Mb dengan pseudogen juga lebih dari 200. Pada CT18 dijumpai dua plasmid dan salah satunya terkait MDR. Strain Ty2 tidak memiliki plasmid dan sensitif pada antibiotik. Genom TY2 mengandung kromosom sirkuler dengan 4,791,961 bp dengan jumlah rata-rata kandungan GC sebesar 52.05% (Deng *et al.* 2003).

Meskipun demikian, keragaman global, struktur genetik populasi, dan sejarah evolusi dari *S. typhi* masih sangat kurang dipahami. Spekulasi pada *S. typhi*, yang secara eksklusif terdapat di Indonesia memiliki antigen flagellar z66. Antigen flagellar merupakan antigen berupa protein flagellin oleh gen *fliC* yang mengekspresikan flagellin H:d dan H:j. *S. typhi* yang mengekspresikan flagellin H;j hanya ditemukan di Indonesia. Selain itu ada juga flagellin z66 yang disandi oleh *fliB266* (Frankel *et al.* 1989).

Penelitian sejarah evolusi dan struktur populasi genetik *S. typhi* dilakukan dengan menemukan mutasi. Hal ini dilakukan pada 200

fragmen gen yang terdiri atas masing-masing 500 bp dari 105 strain yang dikumpulkan secara global. Pada 200 gen tersebut meliputi 121 *housekeeping gene*, 50 gen pengkode struktur permukaan sel, regulasi dan patogenisitas dan 29 pseudogen (Rougemagnac *et al.* 2006). Keberadaan 200 gen tersebut menunjukkan telah terjadi distrupsi dan inaktivasi. Baker and Dougan, 2007 menyebutkan, distrupsi dan inaktivasi tersebut merujuk pada pseudogen dan gen yang terdapat pada pseudogen *S.typhi* tersebut terdapat pula pada *S. enterica serovar paratyphi A*. Beberapa gen tersebut memiliki gen inaktif akibat mutasi yang identik. Hal ini menunjukkan adanya asal evolusi yang sama.

Tabel 2. Gambaran genom *Salmonella typhi* CT 18 (Parkhill *et al.* 2001)

Component of genome	Property
Chromosome	
Total size	4,809,037 bp
G+C content	52.09%
Coding sequences	4,599
... of which pseudogenes	204
Coding density	87.6%
Average gene length	958 bp
Ribosomal RNAs	6 × (16S–23S–5S), 1 × (16S–23S–5S–5S)
Transfer RNAs	78
Other stable RNAs	8
pHCM1	
Total size	218,150 bp
G+C content	47.58%
Coding sequences	249
... of which pseudogenes	8
Coding density	83.8%
Average gene length	759 bp
pHCM2	
Total size	106,516 bp
G+C content	50.6%
Coding sequences	131
... of which pseudogenes	0
Coding density	87.1%
Average gene length	708 bp
Transfer RNAs	1

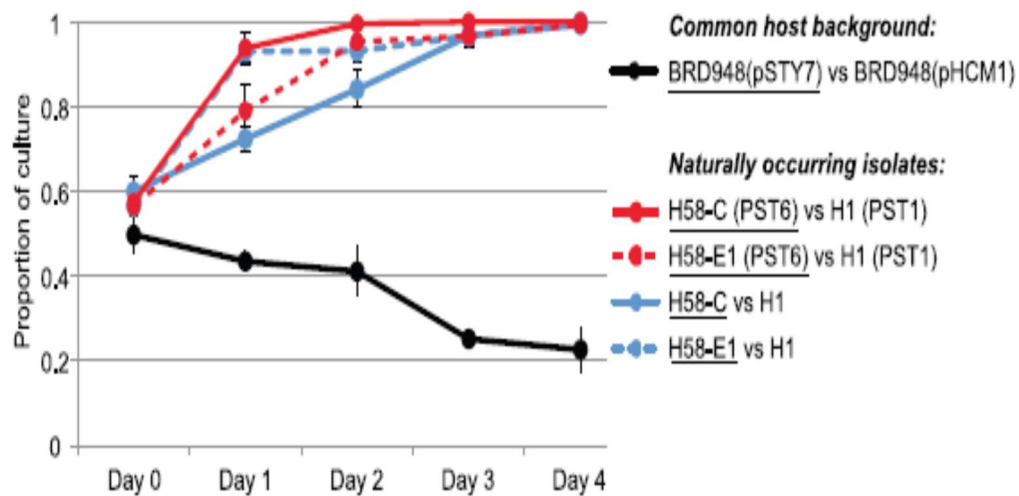
G. Multiple Drug Resistance (MDR) *S. typhi* H58

Melalui skema pengelompokan berdasarkan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *S.typhi* dapat distratifikasi menjadi haplotype. Melalui pendekatan ini, klonal MDR haplotye *S. typhi*, H58 muncul dengan frekuensi yang terus meningkat di beberapa negara di Afrika dan Asia. Dengan adanya H58 ini, plasmid MDR IncHI1 dan mutasi titik kromosomal bukan lagi hal yang baru (Wong *et al*, 2015). Holt *et al*, 2011 melaporkan MDR pada *S. typhi* secara eksklusif dimungkinkan adanya tansmisi plasmid IncHI1 yang membawa gen-gen yang resisten terhadap antibiotik. Hasil penelitian ini diperoleh setelah dilakukan identifikasi 300 lebih *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) pada region plasmid IncHI1 dan melakukan genotyping baik NSP Plasmid dan SNP genotyped kromosom 450 *S. typhi* yang dikumpulkan mulai tahun 1958. Hasilnya menunjukkan bahwa sejak awal tahun 1995, berbagai ragam tipe plasmid telah terdeteksi pada haplotype *S. typhi*. Plasmid-plasmid dengan kemiripan tinggi diketahui merupakan haplotype *S. typhi*. Hal ini menunjukkan adanya transfer plasmid. Hal yang berbeda terjadi sejak tahun 1995, sekitar 98% plasmid *S. typhi* MDR memiliki urutan tipe 6 atau biasa disebut *plasmid sequence type 6* (PST6) dan *S. typhi* haplotipe H58. Ini mengindikasikan adanya penyebaran global klon MDR.

Untuk mengetahui perbandingan antara PST6 dan plasmid IncHI1, Holt *et al*, 2011 melakukan uji fenotiping dengan membandingkan pengaruh plasmid IncHI1 PST6 dan plasmid PST1 pada inang *S. typhi*.

Plasmid PST6 memiliki kemampuan tumbuh pada medium garam dengan konsentrasi tinggi (NaCl 4.7%). Untuk mengidentifikasi SNP pada plasmid, dilakukan analisis urutan/sikvens. Hasilnya menunjukkan dari semua isolat yang dikumpulkan sebelum tahun 1995 terdapat variasi haplotype plasmid dan haplotype bakteri *S. typhi*. Ini menunjukkan tingginya laju tifoid MDR disebabkan kombinasi plasmid typhi (Holt *et al*, 2011). Dalam studi ini Holt *et al*, 2011 menemukan bukti adanya transfer plasmid pada *S. typhi* yang lebih tua dan secara umum tifoid MDR terbaru merupakan kombinasi plasmid tunggal (*S. typhi* H58-IncHI1 plasmid ST6).

Ekspansi H58 ini telah dilaporkan sebelumnya dan telah mencapai Afrika (Rougmnagnac *et al.*, 2006). Holt *et al.*, 2011 menyebutkan bahwa pada pelacakan *S. typhi* dan plasmid MDR yang dikumpulkan dari 450 pasien sejak tahun 1958 menunjukkan adanya dominansi penyebaran MDR sebagai kombinasi *S. typhi* dan plasmid. Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa tifoid MDR senantiasa ditujukan pada kombinasi plasmid dan inang (*S. typhi* H58-IncHI1 Plasmid PST6) atau dengan kata lain *S. typhi* H58 senantiasa diasosiasikan dengan akuisisi plasmid PST6 (gambar 11.)



Gambar 11 : Uji kompetitif *S. typhi* H58 dan H1 dengan atau tanpa Plasmid IncHI1 (Holt *et al.*, 2011).

Hasil analisis data menunjukkan plasmid PST6 plasmid berasal dari nenek moyang *S. typhi* H58. Ini mengindikasikan adanya ekspansi *S. typhi* H58 yang sebelumnya diawali dengan akuisisi plasmid. Sebagaimana diketahui, *S. typhi* H58 tertua yang diisolasi adalah 9105928K yang diambil dari India pada tahun 1991 dan ternyata merupakan MDR. Ini menunjukkan bahwa inisiasi ekspansi *S. typhi* H58 memiliki hubungan dengan akuisisi plasmid PST6 (Holt *et al.*, 2011).

Chiou *et al.*, 2014 menyimpulkan bahwa *multidrug Resistant* pada *S. typhi* senantiasa dihubungkan dengan perpindahan plasmid IncHI1 yang membawa panel gen resisten terhadap ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sulfonamid, tetrasiklin dan trimethoprim. Studi yang dilakukan Holt *et al.*, 2011 menunjukkan sejak 1995 terdapat 98% *S.*

typhi MDR yang merupakan H58 yang membawa pasmid IncHI1 tipe 6 (PST6).

Dalam laporan penelitian yang dilakukan oleh Wong *et al.*, 2015 dijelaskan bahwa isolat H58 pertama kali didapatkan pada tahun 1992 (Fiji) dan 1993 (Fiji dan Vietnam). Keberadaan isolat H58 ini terus meningkat setiap tahun mulai 1992 hingga 2013. Ini menunjukkan terjadi peningkatan 40% setiap tahunnya. Gen resisten yang paling umum yang terdeteksi adalah *blaTEM-1* (resisten terhadap ampisilin), *dfrA7*, *sul1* dan *sul2* (resisten terhadap trimethoprim dan sulfonamida), *catA1* (resisten terhadap kloramfenikol) dan *strAB* (resisten terhadap streptomisin) dan gen-gen tersebut ditemukan pada isolat H58.

Dyson *et al.* 2019. Menyebutkan bahwa sejak tahun 1970an terjadi peningkatan penyebaran *S. typhi* dengan genetik tertentu yaitu Haplotype 58 (H58). H58 ini disimpulkan memiliki hubungan dengan fenotip MDR.

H. Definisi Operasional

1. Demam tifoid : penderita dengan infeksi *S. typhi* dan mempunyai gejala seperti demam, lidah kotor, sakit kepala, nafsu makan menurun, bradikardi relatif, mual, dan nyeri otot.
2. Resistensi antibiotik adalah tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya.

3. *Multi Drugs Resistance* (MDR) pada penderita demam tifoid adalah resistensi terhadap antibiotik lini pertama yaitu Kloramfenikol, Ampisilin atau Amoxicillin dan Trimetroprim-sulfametoksazol.
4. *Salmonella typhi* MDR H58 adalah strain *Salmonella typhi* yang membawa gen-gen *blaTEM-1* (resisten terhadap ampisilin), *dfrA7*, *sul1* dan *sul2* (resisten terhadap trimethoprim dan sulfonamida), *catA1* (resisten terhadap kloramfenikol), *strAB* (resisten terhadap streptomisin), dan gen terkait resisten pada fluoroquinolon (*gyrA*).

I. Hipotesis

1. Terdapat *S.typhi* dengan tingkat sensitivitas terhadap antibiotik dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan uji sensitivitas antimikroba
2. Terdapat gen resisten antibiotik melalui deteksi plasmid IncHi1 *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR
3. Terdapat gen *gyrA* terkait resisten pada fluoroquinolon pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR
4. Terdapat *S.typhi* dari penderita demam tifoid yang resisten antibiotik di Makassar berdasarkan teknik *simple-PCR* berdasarkan *S. typhi* MDR H58

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah jenis penelitian *Cross Sectional* mengenai analisis keberadaan *Salmonella typhi Multi-Drug Resistant* H58 pada penderita demam tifoid di Makassar.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian ini adalah penderita demam tifoid dan sampel penelitian berupa isolat *Salmonella typhi* yang diambil dari darah pasien penderita demam tifoid di berbagai rumah sakit dan puskesmas di Makassar.
2. Teknik sampling dilakukan secara *adequasi of finite purposive sample*.
3. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel

1. Kriteria Inklusi

Batasan kriteria inklusi sampel adalah sampel berasal dari pasien yang didiagnosa menderita demam tifoid dan dari kultur menunjukkan hasil identifikasi positif *Salmonella typhi*

2. Kriteria Eksklusi

Batasan kriteria eksklusi sampel adalah sampel berasal dari pasien yang didiagnosa menderita demam tifoid dan dari kultur menunjukkan hasil identifikasi negatif *Salmonella typhi*

D. Analisis Data

Data berupa isolat *Salmonella typhi*, hasil uji *disc diffusion*, keberadaan plasmid, gen *gyrA* dan H58 akan diintrepetasi dan dianalisis secara diskriptif.

E. Bahan dan alat

1. Bahan

Medium oxbile Broth (Merck), Salmonella Shigella Agar (SSA), Triple sugar iron agar (TSIA), Solid Indol mutiliti (SIM), Methil Red VOGES Proskauer (MRVP), Simon citrate Agar (SCA), urea dan uji gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa dan manitol), pewarnaan gram, larutan NaCl 0,9%, Mueiler-Hilton Agar (Merck), NaCl 0.9%, *paper disc* yang mengandung antibiotik, *High purity analytical grade celite* (Diatom) (Jansen Chemica, Beerse, Belgium 10.846.79), *Guanidium thicyanat* (GuSCN) (Fluka Chemie), Diamine Tetra Acetat (EDTA), Aseton, buffer TE (Tris-EDTA), Aquades steril, enzim Taq polymerase (Takara Ex Taq, TM), buffer PCR 10X (Takara Bio, Inc. japan), Primer-primer Forward dan Reverse, aquades steril, gel agarosa 2%, Tris Borat EDTA (buffer TBE) 10x, Loading buffer dan *Ethidium Bromida* (EtBr)

2. Alat

Cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, botol reagen, batang pengaduk, gelas ukur, sendok tanduk, neraca analitik, ose, Bunsen, incubator, autoklaf, tabung pengenceran, paper disc, antibiotic, mikropipet dan tip, antibiotic, tabung ependorf, *vortex shaker*, *waterbath*, *sentrifuse*, *Harmle Z229*, pompa vakum, *stop watch*, *gyratory shaker*, *freezer -20° C*, mikropipet dan tip filter, rak tabung eppendorf, *DNA thermal cycler* (mesin PCR), lemari pendingin 4 °C, mesin elektroforesis dan *power supply*, perangkat UV light, kaca mata anti UV dan kamera digital.

E. Protokol Kerja

1. Kultur dan Identifikasi

Darah dimasukkan ke dalam medium oxbile 1:10 kemudian diinkubasi pada temperatur 35-37° C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian diinokulasi ke medium *Salmonella-Shigella Agar (SSA)* dan diinkubasi pada temperature 37° C selama 24 jam. Diamati pertumbuhan koloni, jika ada, dilanjutkan pada medium *Triple Sugar Iron (TSI)*, diinkubasi 35-37° C selama 18-24 jam, medium *Solid Indol Motility (SIM)* *Methyl Red- Voges Proskauer (MR-VP)*, *Simon Citrate Agar (SCA)*, uji biokimia yang masing-masing diinkubasi 35-37° C selama 18-24 jam.

2. Uji *disc diffusion*

Pengenceran dilakukan pada suspensi *Salmonella typhi* dari kultur untuk mengetahui tingkat kekeruhan dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5. Pada kepekaan yang sesuai dengan 0,5 standar Mc Farland

mengandung bakteri $1,5 \times 10^8$ /ml. Bakteri kemudian ditanam pada permukaan agar dengan dilakukan swab secara merata pada media Mueller Hinton Agar. Dibiarkan selama 10 menit agar bakteri menempel pada permukaan media. Masing-masing disk sebanyak yang mengandung antibiotik kemudian diletakkan pada media Mueller Hinton Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk akan diukur dan diinterpretasi berdasarkan Clinical and Laboratory Standards Institute.

3. Isolasi DNA (Hatta, M. 2001, Boom, R.C.J.A.,1990)

Sebanyak 100 μl kultur *S. typhi* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan 900 μl buffer L6. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, kemudian endapan diambil dan ditambahkan 20 μl suspensi diatomea (celite) yang sebelumnya dihomogenkan dengan *vortex Shaker*. Setelah penambahan suspensi celite, campuran dihomogenkan kembali lalu diaduk dengan gyrotori shaker pada kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dari endapan (pelet) dengan menggunakan pompa vakum, endapan kemudian dicuci dengan menambahkan 1 ml buffer L2, dihomogenkan dan selanjutnya disentrifugasi lagi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik.

Pencucian dengan menggunakan buffer L2 dilakukan dua kali. Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 1 ml etanol 70%,

dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dari endapan (pellet) menggunakan pompa vakum. Pencucian dengan menggunakan etanol 70% dilakukan dua kali.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 1 ml aseton, dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Aseton kemudian dipisahkan dengan membuka tutup tabung eppendorf lalu dimasukkan dalam inkubator dengan temperatur 65°C selama 10 menit.

Suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik, lalu sekitar 40-50 µl dari supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf yang baru (tabung pertama). Pada endapan celite yang tersisa ditambahkan 40 µl buffer TE, dihomogenkan dan diinkubasi dalam inkubator selama 10 menit temperatur 56°C. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian diambil 40-50 µl supernatan yang terbentuk dan digabung dengan supernatan pertama.

4. Isolasi DNA Plasmid (Kado and Liu, 1981)

Kultur *S. typhi* berumur 1 hari dalam BHI Broth sebanyak 1.5 ml di sentrifugasi 4000 RPM selama 20 menit dan ditambahkan 100µl larutan 1 (Tris HCl pH 7.5-8; 10 mM EDTA; 50mM Glukosa) dicampur dengan cara divortex, kemudian didiamkan selama 5 menit. Ditambahkan 200 µl larutan 2 (0,2 N NaOH; 1% Sodium Dedsil Sulfat) dan campur.

Ditambahkan 150 µl larutan 3 (Kalium Acetat 3% pH 4,8) vortex selama 10 detik. Tabung dibenamkan dalam es selama 5 menit lalu disentrifus. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf baru, ditambahkan campuran phenol dan kloroform (1:1) sejumlah volume yang sama dengan supernatant yang didapat campur dengan vortex. Disentrifus selama 2 menit. Fasa air (fasa atas) dipindahkan dengan hati-hati ke dalam tabung ependorf baru, disentrifus lagi selama 2 menit, lalu dipindahkan lagi fasa air yang masih tampak ke dalam tabung ependorf baru yang lain. Ditambahkan 1 ml ethanol pa, divortex benamkan lagi dalam es selama 5 menit. Disentrifuge selama 20 menit, kemudian buang supernatan. Ditambahkan kembali 1 ml ethanol pa, campur dengan jalan membalik-balikkan tabung beberapa kali. Disentrifuge selama 20 menit dengan posisi dengan posisi orientasi (yaitu arah dan kedudukan tabung dalam alat centrifuge) sama dengan sentrifuge tahap 10. Supernatant dibuang dan dikeringkan dalam oven 50 °C. Resuspensi plasmid dalam 50 µl TE (10 mM Tris pH7.4 atau 0.1211 g%; 1 mM EDTA pH 8 0.0372 g%).

5. Deteksi *Salmonella typhi*

Sebanyak 2 µl ekstrak DNA dimasukkan dalam tabung PCR yang berisi 22,5 µl PCR mix (2,5 µl 10x buffer 10x, 0,5 µl Taq DNA polymerase, 2 µl MgCl₂, 2,5 µl dNTP, 15 µl aquades (ddH₂O), primer forward : (5'-ACTGCTAAAACGACTACT-3'), reverse: (5'-TTAACGCAGTAAAGAGAG - 3') masing-masing 1 µl. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR dengan tahap, denaturasi awal 95 °C selama 10 menit,

selanjutnya dilakukan sebanyak 35 siklus, dimana setiap siklus terdiri atas denaturasi 96 °C selama 30 detik, *annealing* 56°C selama 30 detik, *extension* pada suhu 70 °C selama 1 menit. Proses ini dilanjutkan dengan 72 °C selama 1 menit.

6. Deteksi Plasmid IncHI1

Sebanyak 2,5 µl ekstrak DNA sampel dimasukkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi 22,5 µl PCR mix sehingga volume dalam tabung PCR menjadi 25 µl. Komposisi dari PCR mix adalah: 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 IncHI1 forward : (5'- GGTCCAACCCATTGCTTTAC -3'), 1 µl primer IncHI1 reverse: (5'- CACGGAAAGAAATCACAAC -3'), 0,5 µl Taq DNA polymerase, 2,5 µl dNTP, 15 µl aquades (ddH₂O). Melakukan amplifikasi pada mesin PCR sebanyak 30 siklus dengan denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 3 menit kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik. *Annealing* pada suhu 58 °C selama 30 detik, *extension* pada suhu 72 °C selama 30 detik.

7. Deteksi gen GyrA

DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan PCR menggunakan Primer untuk *gyrA* (Ling *et al.* 2003). PCR dilakukan dengan menggunakan TMDreamTaq Green PCR Master Mix dengan total reaksi volume 50 µl yang terdiri dari 25 µl 2x DreamTaq Green PCR Master Mix, 1 µl dari 1 µM stok primer yang akan menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran 347 pb, (F, 5'-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3' dan R, 5'-

TACCGTCATAGTTATCCACG -3') dan 1 µl of DNA templat. Campuran reaksi PCR diamplifikasi sebanyak 35 siklus dengan denaturasi awal 95°C selama 5 menit, denaturasi selanjutnya dengan tempertur 94°C selama 1 menit, *annealing* 52°C selama 1 menit, dan *exstension* 72°C selama 1 menit. *Extension* akhir pada 72°C selama 5 menit.

8. Deteksi *S. typhi* H58 MDR

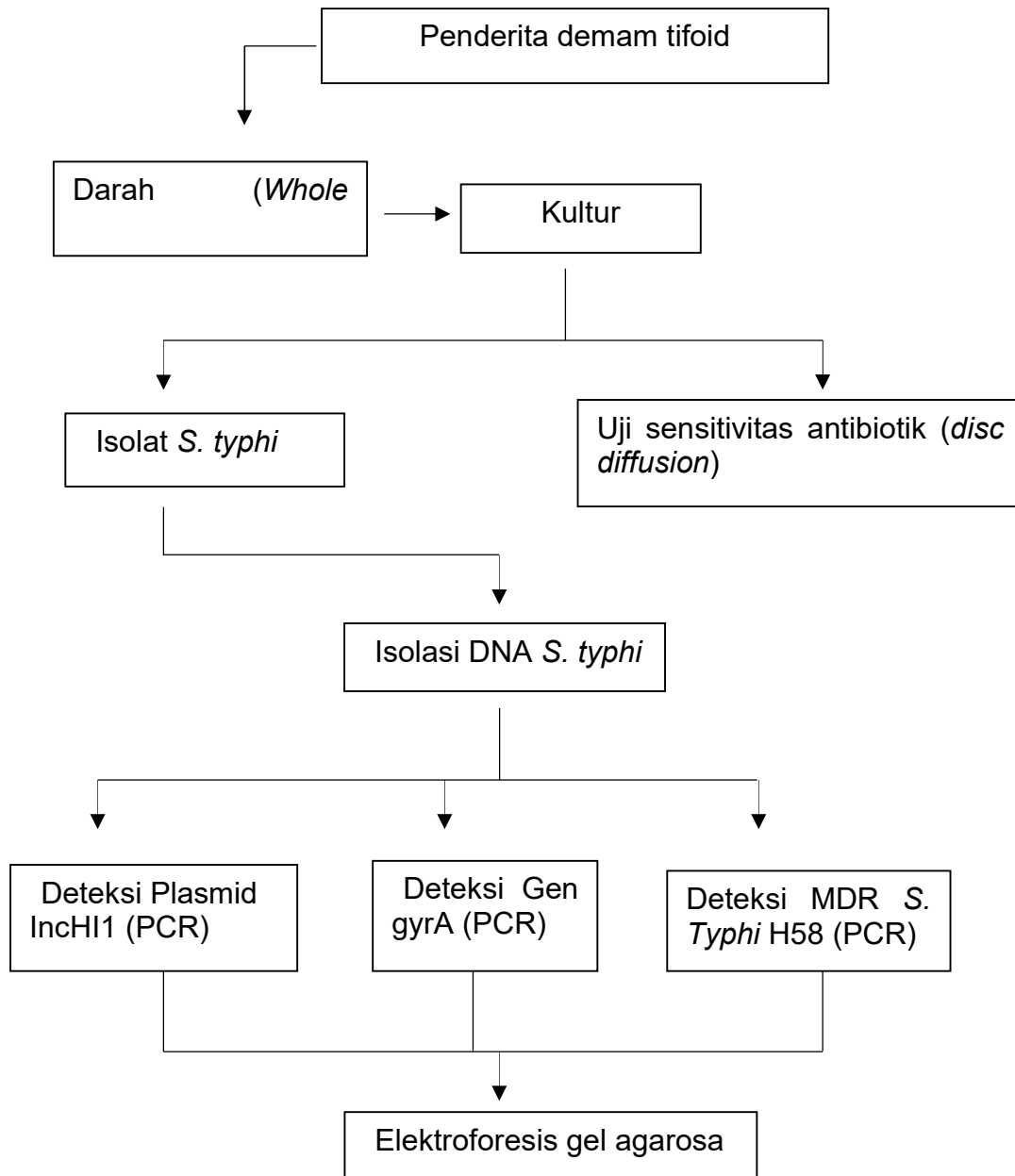
Proses ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diisolasi. Terlebih dahulu dibuat PCR-mix yang akan diamplifikasi sebanyak 22,5 µl yaitu 2,5 µl buffer PCR 10X, 0,5 µl Taq polimerase, 2 µl MgCl₂, 2 µl dNTPs, 13,5 µl aquadest, kemudian ditambahkan primer forward dan primer Reverse, masing masing 1 µl. Selanjutnya sebanyak 2,5 µl ekstrak DNA ditambahkan ke dalam 22,5 µl campuran PCR primer Forward (5'-AATAGGCCTCATCACGTTTCG-3') dan primer Reverse (5'-CAAACCGTTGAATCGGAAGT-3'). Primer ini akan menghasilkan produk amplifikasi sebesar 993 bp Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan tahap pertama 94 °C selama 2 menit dan dilanjutkan dengan 40 siklus masing 60 detik pada 94 °C; 45 detik pada 57 °C; dan 60 detik pada 72 °C. Proses ini dilanjutkan dengan 72 °C selama 2 menit dengan menggunakan mesin PCR (Thermal cycler Applied Biosistem 2720). Setelah itu hasil amplifikasi dari campuran PCR diambil masing-masing 2,5 µl dan dimasukkan ke dalam campuran *loading buffer* untuk dielektroforesis.

9. Deteksi produk-produk PCR

Masing-masing 2,5 µl produk amplifikasi PCR dicampur dengan 2 µl larutan loading. Campuran kemudian dipipet ke dalam sumur gel agarosa 2% yang terendam dalam buffer TBE di dalam tanki elektroforesis.

Selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Setelah 1 jam, elektroforesis dihentikan, gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil elektroforesis kemudian didokumentasikan dengan kamera. Hasil positif adanya *Salmonella typhi* dengan teknik PCR ditunjukkan adanya produk amplifikasi dengan ukuran 458 bp (Song *et al.*, 1993 dan Haque *et al.*, 2001) . Hasil positif adanya plasmid IncHI1 yaitu adanya produk amplifikasi dengan ukuran 365 bp (Chiou *et al.* 2014, Kariuki *et al.*, 2003., Robertson, *et al.*, 2002 dan Gabant *et al.*, 1993). Hasil positif adanya gen gyrA dengan adanya produk amplifikasi ukuran 347 bp (Misra *et al.*, 2016, PhanTanh *et al.*, 2013 dan Ling *et al.*, 2003.) dan hasil positif adanya H58 dengan adanya produk amplifikasi ukuran 993 bp (Holt *et al.*, 2008. dan Murgia *et al.*, 2016)

F. Alur Penelitian



G. Etik Penelitian

Penelitian dilaksanakan setelah mendapatkan Surat Rekomendasi Persetujuan Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, RSPTN Universitas Hasanuddin, RSUP Wahidin Sudirohusodo dengan Nomor : 286/H4.8.4.5. 31/PP36-KOMETIK/2018

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Sampel dalam penelitian ini berupa isolat *Salmonella typhi* yang diambil dari darah pasien penderita demam tifoid di berbagai rumah sakit dan puskesmas di Makassar.

Data yang dikumpulkan dalam penelitian berupa data karakteristik penderita demam tifoid, keluhan penderita demam tifoid, resistensi antibiotik dan hasil pemeriksaan laboratorium meliputi kultur dan PCR. Data yang telah dikumpulkan kemudian diinput ke komputer dan dianalisis menggunakan program SPSS. Hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik disertai dengan penjelasan.

1. Karakteristik penderita demam tifoid

Jumlah sampel suspek penderita demam tifoid dari rumah sakit dan puskesmas di Makassar sebanyak 367 penderita.

Karakteristik penderita demam tifoid dalam penelitian ini meliputi umur, jenis kelamin, lama demam dan suhu tubuh. Distribusi Karakteristik penderita demam tifoid sebagai berikut:

Tabel 3. Karakteristik penderita demam tifoid

Karakteristik penderita demam tifoid	n(367)	%
Usia (mean, min-max)	24,1 (17- 62)	
Lama demam (mean, min-max)	5,5 (4 – 9)	
Suhu (mean, min-max)	38,1 (37,8 – 39.5)	
Kelompok umur		
< 20	164	44,7
20 -29	127	34,6
30 – 39	48	13,1
40- 49	24	6,5
≥50	4	1,1
Jenis kelamin		
Laki-Laki	147	40,1
Perempuan	220	59,9
Lama demam (hari)		
4-5	228	62,1
6-7	124	33,8
8-9	15	4,1

Sumber : data primer

Tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata usia penderita demam tifoid adalah 24,1 tahun dengan usia termuda 17 tahun dan usia tertua 62 tahun. Frekuensi kelompok umur tertinggi adalah kurang dari 20 tahun sebanyak 164 orang (44,7%) dan terendah adalah lebih dari atau sama dengan 50 tahun sebanyak 4 orang (1,1%). Perbandingan ratio antara jenis kelamin laki-laki dan perempuan adalah 66,8, dimana ditemukan 147 laki-laki dan perempuan sebanyak 220 orang. Rata-rata lama demam adalah 5,5, hari, paling cepat demam 4 hari dan paling lama 9 hari. Frekuensi tertinggi lama demam adalah 4-5 hari sebanyak 228 orang (62,1%) dan terendah 8-9 hari sebanyak 15 orang (4,1%). Rata-rata suhu tubuh penderita adalah 38,1 °C.

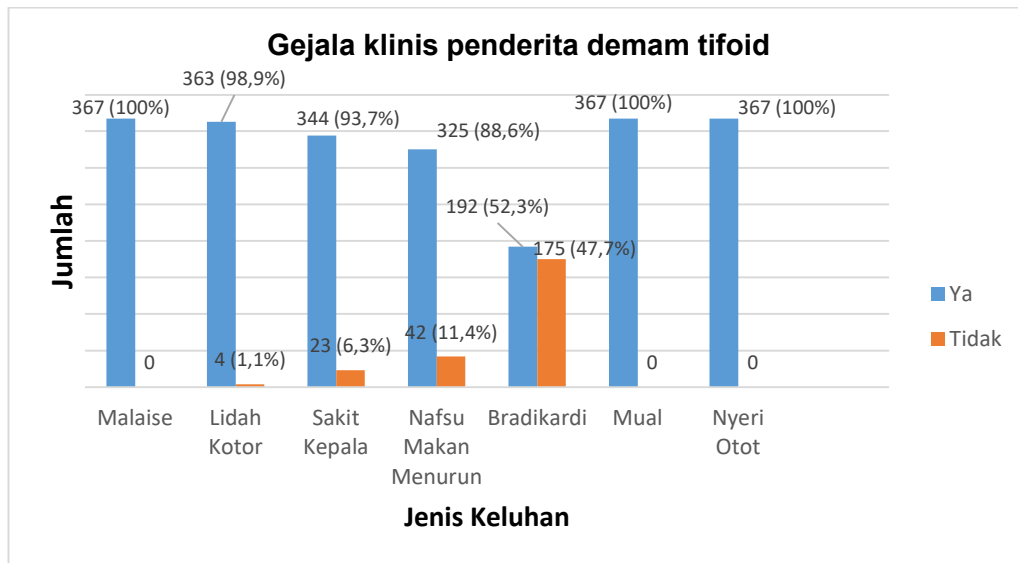
Gejala klinis yang dialami penderita demam tifoid dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4. Gejala klinis penderita demam tifoid

Jenis keluhan	Ya		Tidak	
	Jumlah	%	Jumlah	%
Malaise	367	100,0	0	0,0
Lidah Kotor	363	98,9	4	1,1
Sakit Kepala	344	93,7	23	6,3
Nafsu Makan Menurun	325	88,6	42	11,4
Bradikardi	192	52,3	175	47,7
Mual	367	100,0	0	0,0
Nyeri otot	367	100,0	0	0,0

Sumber : data primer

Tabel 4 menunjukkan bahwa semua penderita demam tifoid mengalami gejala malaise (100%), 363 orang (98,9%) dengan gejala lidah kotor, 344 orang (93,7%) mengalami gejala sakit kepala, 325 orang (88,6%) mengalami gejala nafsu makan menurun, 192 orang (52,3%) mengalami gejala bradikardia relatif, 367 (100%) mengalami nyeri otot dan 367 (100%) mengalami mual. Grafik gejala klinis ini dapat dilihat pada grafik 1. sebagai berikut :



Grafik 1. Gejala klinis penderita demam tifoid

2. Hasil uji widal

Uji widal merupakan uji serologi yang dilakukan pada suspek penderita demam tifoid. Hasil uji Widal dapat dilihat pada tabel berikut:

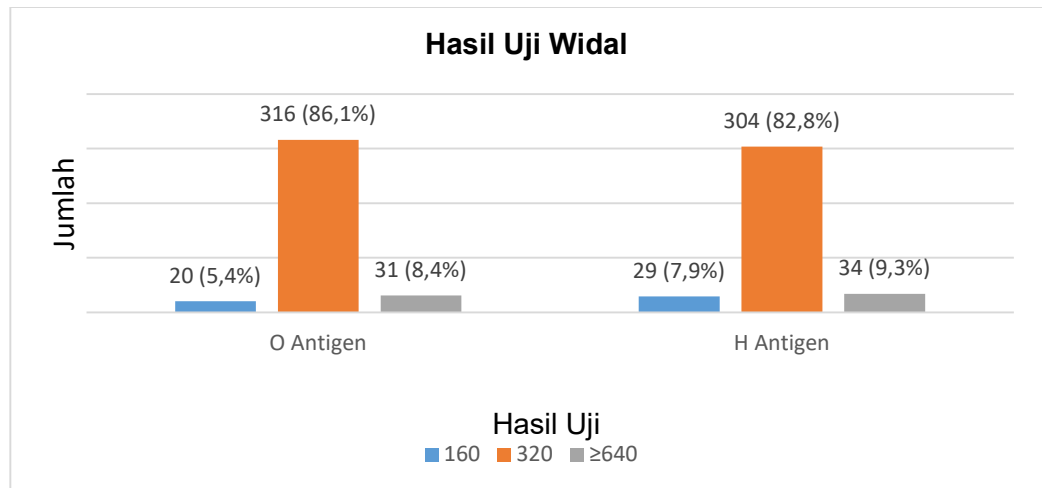
Tabel 5. Hasil Uji Widal

Hasil Uji Widal	n(367)	%
O Antigen		
160	20	5,4
320	316	86,1
≥640	31	8,4
H antigen		
160	29	7,9
320	304	82,8
≥640	34	9,3

Sumber: data primer

Tabel 5 menunjukkan bahwa nilai titer 320 pada antigen O dan antigen H paling banyak dengan masing-masing 316 orang (86,1%) dan

304 orang (82,8%), dan paling rendah adalah 160 masing-masing 20 orang (5,4%) dan 29 orang (7,9%). Sementara titer ≥ 640 pada antigen O dan H terdapat masing-masing 31 orang (81,4%) dan 34 orang (9,3%). Grafik hasil uji widal dapat dilihat pada grafik 2. berikut :



Grafik 2. Hasil uji widal penderita demam tifoid dengan titer 320 pada antigen O dan H sebagai frekuensi tertinggi.

3. Hasil Kultur darah

Keberadaan *Salmonella typhi* pada darah dideteksi dengan metode kultur bakteri. Hasil pemeriksaan kultur darah dari suspek penderita demam tifoid di wilayah Makassar dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 6. Hasil kultur darah suspek penderita demam tifoid

Hasil Kultur Darah	Jumlah	%
Positif		
<i>Salmonella typhi</i>	30	8,2
<i>Salmonella paratyphi</i>	2	0,5
Negatif	335	91,3
Total	367	100,0

Sumber : data primer

Tabel 6 menunjukkan bahwa dari 367 sampel darah dari suspek demam tifoid yang dikultur darah, terdapat 335 (91,3%) kultur yang negatif dan 32 kultur yang positif. Pada kultur yang positif tersebut, terdapat 30 (8,2%) kultur positif *Salmonella typhi* dan 2 (0,5%) kultur positif *Salmonella paratyphi*.

4. Hasil pemeriksaan dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pada 30 isolat *S. typhi* yang dinyatakan positif kultur (tabel 6) dilakukan pemeriksaan dengan teknik PCR. Berdasarkan pemeriksaan tersebut, ditemukan 27 (90%) positif *S. typhi* berdasarkan PCR dan 3 (10%) negatif *S. typhi* (tabel 7).

Tabel 7. Hasil Pemeriksaan DNA *S. typhi* menggunakan PCR

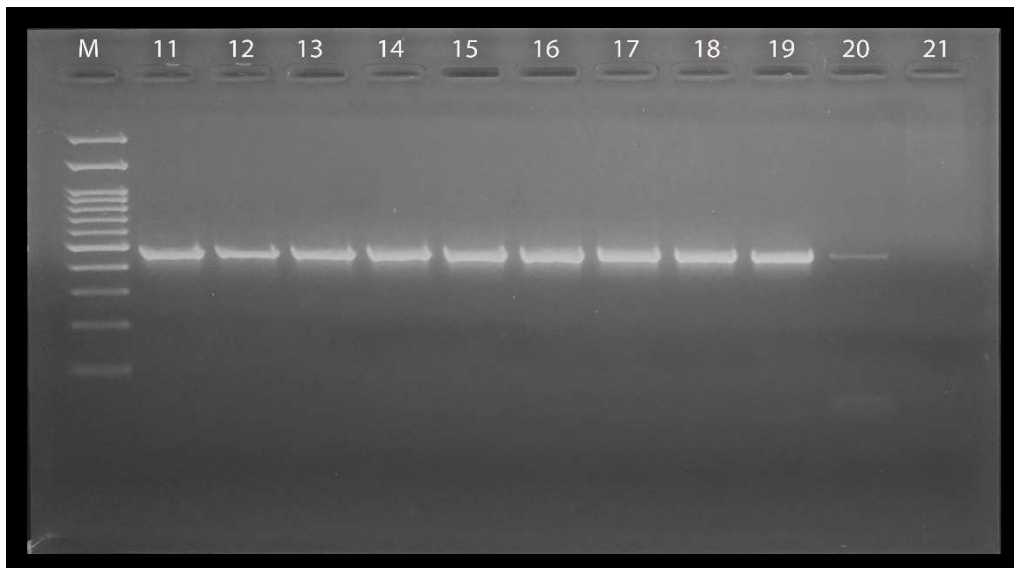
Hasil pemeriksaan DNA <i>S. typhi</i> menggunakan PCR	Jumlah	%
Positif	27	90
Negatif	3	10
Total	30	100

Sumber : data primer

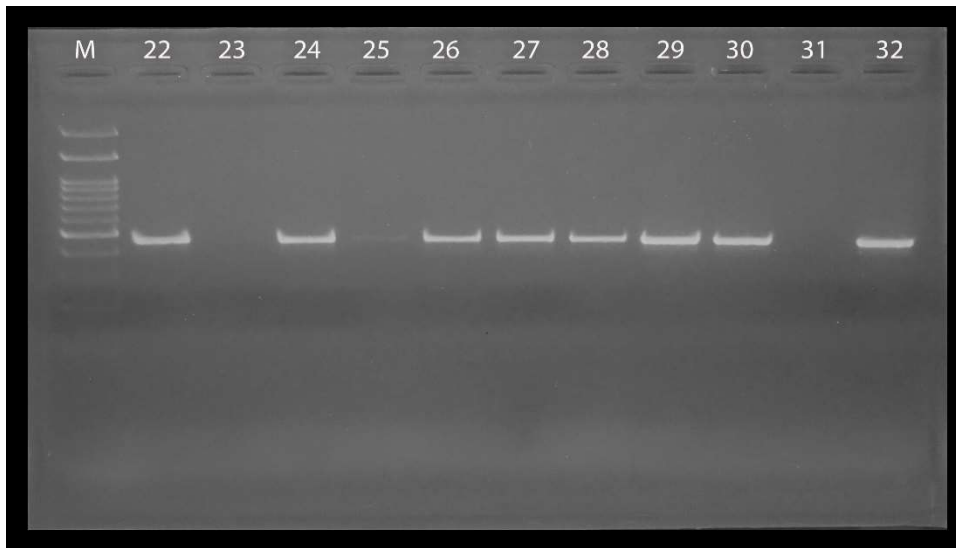
Adapun gambar produk amplifikasi DNA *S. typhi* dengan teknik PCR dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12a. Hasil elektroforesis DNA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, N : Kontrol Negatif, slot 1, dan 2 : negatif *S. typhi*, slot : 3-10 : Positif *S. typhi*.



Gambar 12b. Hasil elektroforesis DNA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, slot 21 : negatif *S. typhi*, slot : 11-20 : Positif *S. typhi*.



Gambar 12c. Hasil elektroforesis DNA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, slot 23 dan 31 : negatif *S. typhi*, slot : 22, 26-30 dan 32 : Positif *S. typhi*.

5. Uji Kepekaan antibiotik

Pada uji kepekaan antibiotik di gunakan uji *disc diffusion*. Melalui uji ini diketahui *Salmonella typhi* yang sensitif dan resisten terhadap satu dan beberapa antibiotik. Kepekaan *S. typhi* terhadap antibiotik dapat dilihat pada tabel berikut:

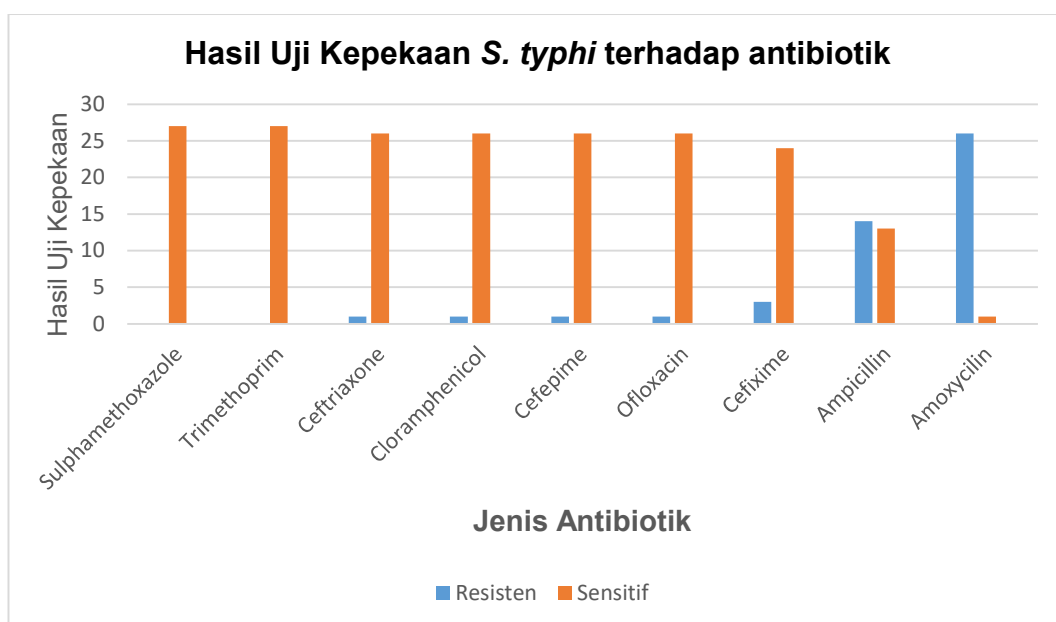
Tabel 8. Hasil Uji Kepekaan *S. typhi* terhadap antibiotik

Jenis antibiotic	Resisten		Sensitif	
	Jumlah (n=27)	%	Jumlah (n=27)	%
Sulphamethoxazole	0	0	27	100
Trimethoprim				
Ceftriaxone	1	3,7	26	96,3
Cloramphenicol	1	3,7	26	96,3
Cefepime	1	3,7	26	96,3
Ofloxacin	1	3,7	26	96,3
Cefixime	3	11	24	88,9
Ampicillin	14	52	13	48,1
Amoxycilin	26	96	1	3,7

Sumber: data primer

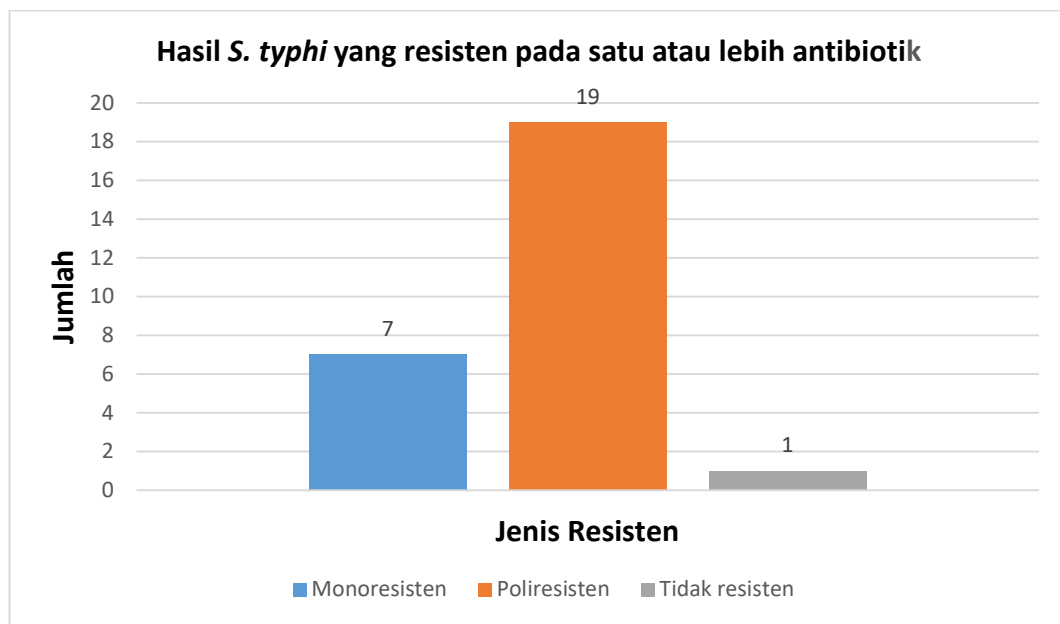
Tabel 7 menunjukkan bahwa antibiotik paling tinggi sensitifitasnya yaitu Sulphamethoxazole Trimethoprim (100%). Beberapa antibiotik yang lain seperti Ceftriaxone, Cloramphenicol, Cefepime dan Ofloxacin masing-masing 96,3%. Adapun antibiotik Cefixime diketahui 88,9% sensitif terhadap antibiotik. Sensitifitas obat antibiotik paling rendah adalah Ampicillin yaitu 48,1% dan Amoxycilin yaitu 3,3%.

Resistensi antibiotik paling tinggi adalah Amoxycilin yaitu 96%, kemudian Ampicillin 52%, Cefixime 11% dan paling rendah yaitu Ceftriaxone, Cloramphenicol, Cefepime dan Ofloxacin masing-masing 3,7%. Grafik mengenai hasil uji kepekaan *S. typhi* terhadap antibiotik dapat dilihat pada grafik 3.



Grafik 3. Hasil uji kepekaan *S. typhi* terhadap antibiotik dengan uji *disc diffusion*

Berdasarkan analisis data, kejadian resistensi pada satu jenis antibiotik (monoresisten) atau lebih dari satu jenis antibiotik (poliresisten) dapat dilihat pada grafik 4. dan tabel 9. sebagai berikut :



Grafik 4. *Salmonella typhi* yang resisten pada satu atau lebih antibiotik

Tabel 9. Hasil *S. typhi* yang resisten pada satu atau lebih antibiotik

Jenis resisten	Jumlah	%
Monoresisten	7	26
Poliresisten	19	70,3
Tidak resisten	1	3,7
Total	27	100

Sumber : data primer

Tabel 9 menunjukkan bahwa penderita demam tifoid yang hasil pemeriksaan uji kepekaan antibiotik terhadap *S. typhi* menunjukkan adanya monoresisten sebanyak 7 orang (26%) dan poliresisten sebanyak 19 orang (70,3%).

Adapun jenis antibiotik yang monoresisten dan poliresisten tersebut adalah :

Tabel 10. Jenis antibiotik monoresisten dan poliresisten

Jenis Antibiotik	Jumlah	%
Poliresisten :		
Amoxycilin – Ampicillin	13	48
Amoxycilin – Ampicillin – Cefixime	1	3,7
Amoxycilin – Cefixime	1	3,7
Amoxycilin – Cefixime-Ofloxacin	1	3,7
Amoxycilin – Cloramphenicol	1	3,7
Amoxycilin –Ceftriaxon	1	3,7
Amoxycilin –Cefepime	1	3,7
Monoresisten : Amoxycilin	7	26
Tidak resisten	1	3,7
Total	27	100

Sumber : data primer

Tabel 10 menunjukkan bahwa jenis antibiotik yang paling banyak mengalami poliresisten adalah Amoxycilin – Ampicillin yaitu 48%, kemudian Amoxycilin - Ampicillin - Cefixime, Amoxycilin – Cefixime, Amoxycilin – Cefixime-Ofloxacin, Amoxycilin – Cloramphenicol, Amoxycilin –Ceftriaxon, dan Amoxycilin –Cefepime masing-masing 3,7%.

6. Pemeriksaan PCR Plasmid IncH1 *Salmonella typhi*

Hasil pemeriksaan PCR untuk mendeteksi keberadaan plasmid IncH1 dapat dilihat pada tabel 11.

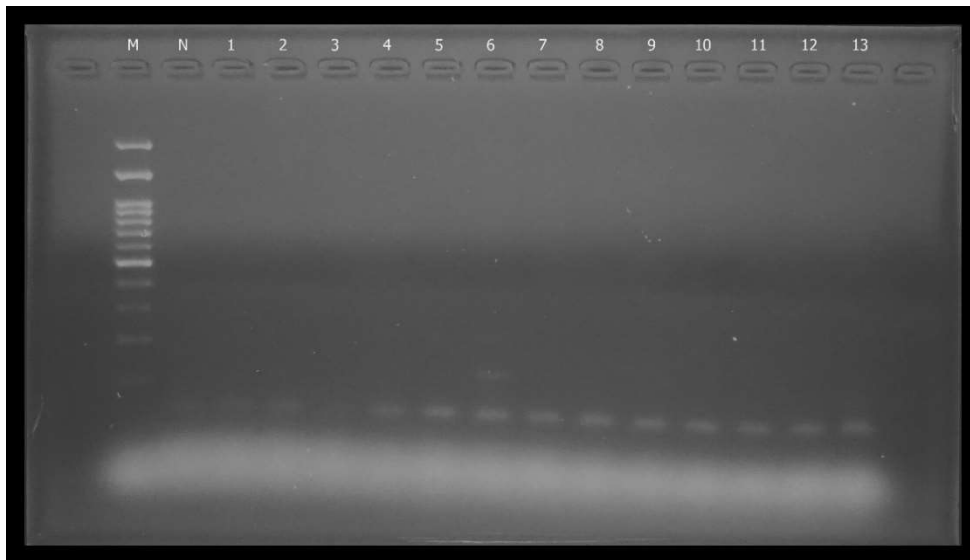
Tabel 11. Hasil Pemeriksaan PCR Plasmid IncH1 *Salmonella typhi*

Hasil PCR Plasmid IncH1 <i>S.typhi</i>	Jumlah	%
Positif	0	0
Negatif	27	100
Total	27	100

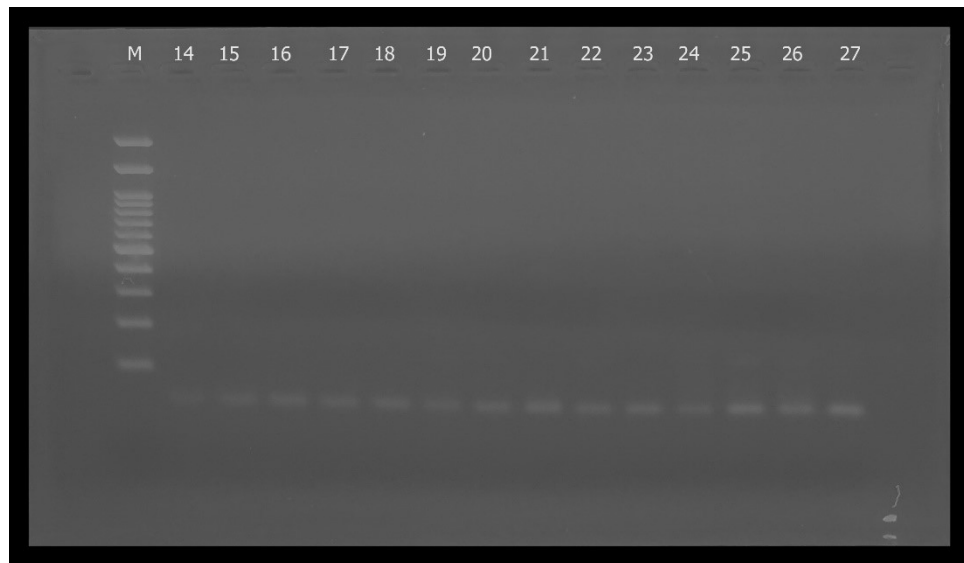
Sumber: data primer

Tabel 11 menunjukkan bahwa tidak ada penderita demam tifoid yang terdeteksi memiliki plasmid IncH1 pada pemeriksaan *S. typhi* dengan PCR.

Adapun gambar elektroforesis pada pemeriksaan PCR Plasmid IncH1 *S. typhi* dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13a. Hasil elektroforesis Plasmid IncH1 *S. typhi* slot M : *Ladder marker*, N : Kontrol Negatif, slot 1-13 : negatif Plasmid IncH1 *S. typhi*



Gambar 13b. Hasil elektroforesis Plasmid IncH1 *S. typhi* slot M : *Ladder marker*, slot 14-27 : negatif Plasmid IncH1 *S. typhi*

7. Pemeriksaan PCR gen *GyrA Salmonella typhi*

Hasil pemeriksaan PCR untuk mendeteksi keberadaan gen *GyrA* dapat dilihat pada tabel 12

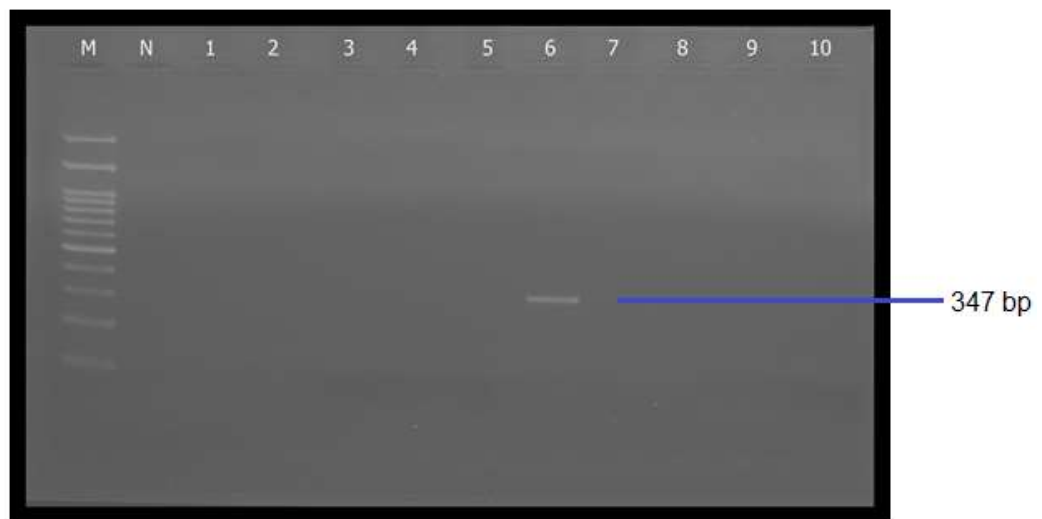
Tabel 12. Hasil Pemeriksaan PCR gen *GyrA Salmonella typhi*

Hasil PCR gen <i>GyrA</i>	Jumlah	%
Positif	1	3,7
Negatif	26	96
Total	27	100

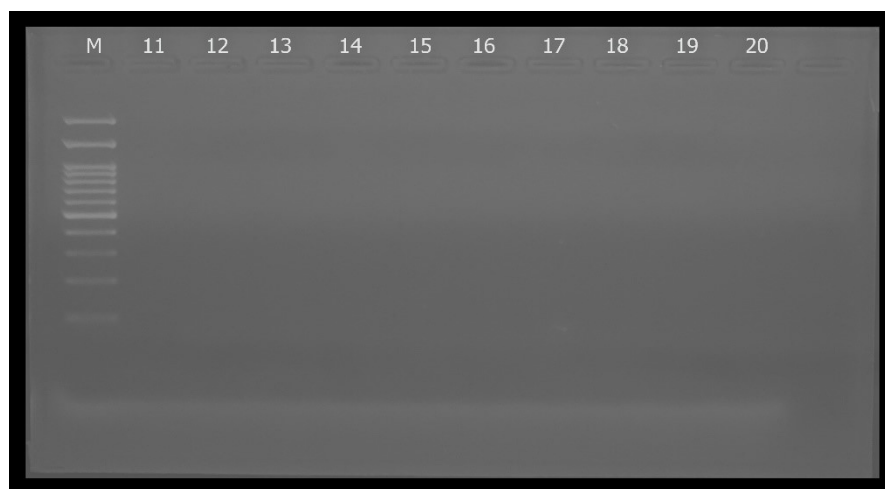
Sumber: data primer

Berdasarkan tabel 12., terdapat satu penderita demam tifoid (3,7%) yang terdeteksi memiliki gen *gyrA* pada pemeriksaan *S. typhi* dengan PCR.

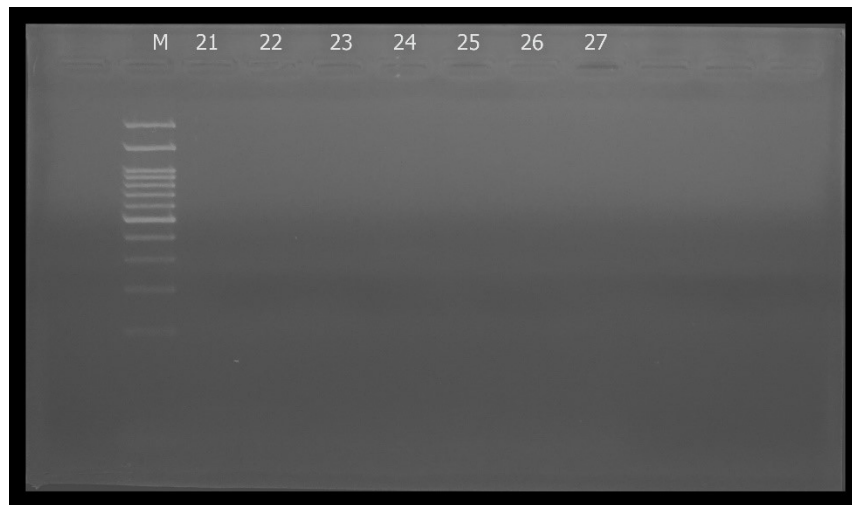
Adapun gambar elektroforesis pada pemeriksaan PCR gen *GyrA S. typhi* dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 14a. Hasil elektroforesis gen GyrA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, N : Kontrol Negatif, slot 1-5, 7-10: negatif *S. typhi*, slot 6 : Positif gen GyrA *S. typhi*



Gambar 14b. Hasil elektroforesis gen GyrA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, slot 11-20 : negatif *S. typhi*.



Gambar 14c. Hasil elektroforesis gen GyrA *S. typhi*, slot M : *Ladder marker*, slot 21-27 : negatif *S. typhi*.

8. Pemeriksaan PCR *Salmonella typhi* H58

Hasil pemeriksaan PCR untuk mendeteksi keberadaan *S. typhi* H58 dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil Pemeriksaan PCR *Salmonella typhi* H58

Hasil PCR H58	<i>S.typhi</i> (n=27)	
	Jumlah	%
Positif	1	3,7
Negatif	26	96
Total	27	100

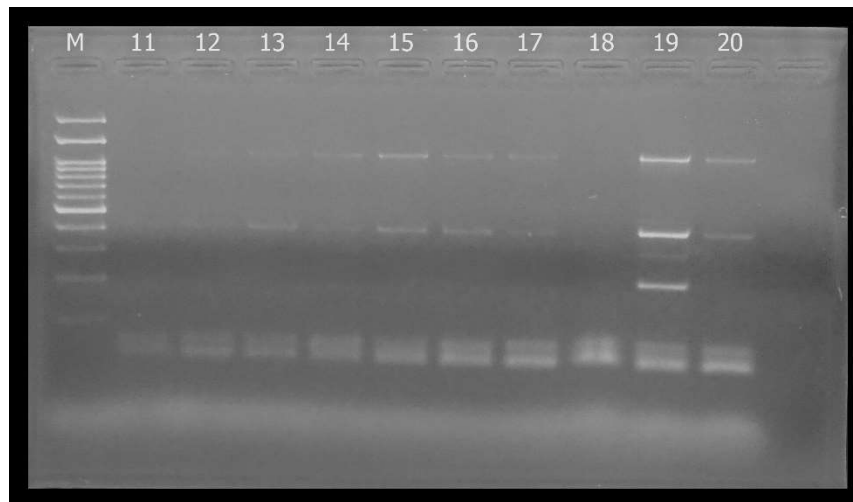
Sumber: data primer

Tabel 13 menunjukkan bahwa terdapat 1 (3,7%) penderita demam tifoid yang menunjukkan positif *S. typhi* H58 berdasarkan hasil pemeriksaan PCR.

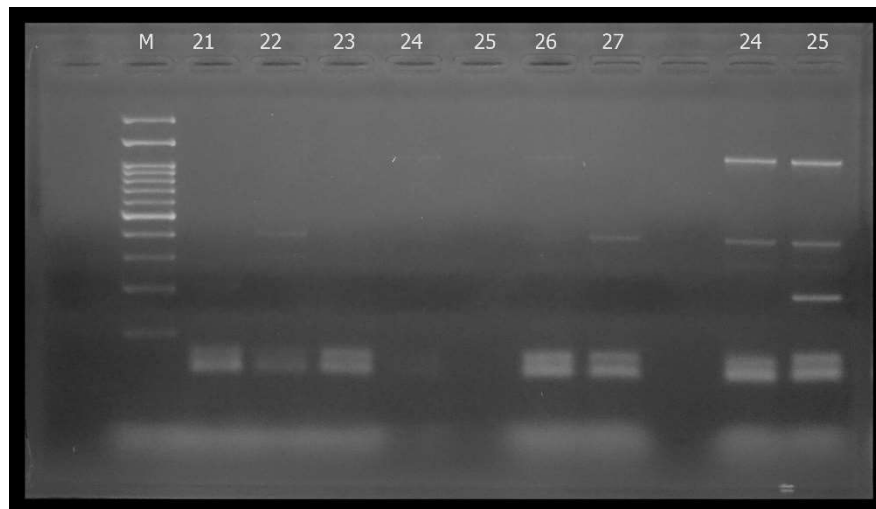
Gambar hasil elektroforesis pada pemeriksaan PCR *S. typhi* H58 dapat dilihat pada gambar 15, sebagai berikut :



Gambar 15a. Hasil elektroforesis *S. typhi* H58, slot M : *Ladder marker*, N : Kontrol Negatif, slot 1-5, 7-27: negatif *S. typhi*, slot 6 : Positif *S. typhi* H58



Gambar 15b. Hasil elektroforesis *S. typhi* H58, slot M : *Ladder marker*, slot 21-25: negatif *S. typhi*



Gambar 15c. Hasil elektroforesis *S. typhi* H58, slot M : *Ladder marker*, slot 21-25: negatif *S. typhi*

B. Pembahasan

1. Karakteristik, gejala klinis dan diagnosis demam tifoid

Sebanyak 367 suspek demam tifoid dari rumah sakit dan puskesmas di Makassar dikumpulkan dengan karakteristik umur, jenis kelamin, lama demam dan suhu tubuh. Pada tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata usia penderita demam tifoid adalah 24,1 tahun dengan usia termuda 17 tahun dan usia tertua 62 tahun. Perbandingan ratio antara jenis kelamin laki-laki dan perempuan adalah 66,8, dimana terdapat 147 laki-laki dan perempuan sebanyak 220 orang. Rata-rata lama demam adalah 5,5 hari, paling cepat demam 4 hari dan paling lama 9 hari. Rata-rata suhu tubuh penderita adalah 38,1 °C. Adapun gejala klinis suspek demam tifoid yang ditemukan dalam penelitian ini adalah malaise, lidah kotor, sakit kepala, gejala nafsu makan menurun, bradikardia relatif, mual dan nyeri otot.

Pada pemeriksaan widal ditemukan nilai titer 320 pada antigen O dan antigen H paling banyak dengan masing-masing 316 orang (86,1%) dan 304 orang (82,8%). Pemeriksaan widal didasarkan terjadinya reaksi aglutinasi antara antigen dan agglutinin yang dideteksi yaitu agglutinin O dan H. Tingginya titer O menunjukkan adanya infeksi aktif dan titer H tinggi menunjukkan pernah divaksinasi atau pernah terinfeksi. Menurut O'leary, 1989, Antigen O (*Ohne*) merupakan antigen somatik dengan lipopolisakarida yang kompleks. Antigen ini bagian dari dinding sel dan senantiasa diasosiasikan dengan endotoksin. Antigen flagella H (*Hauch*) merupakan struktur protein yang berasosiasi dengan flagella. Menurut KMK, 2006, Interpretasi reaksi widal belum ada kesepakatan tentang nilai titer patokan. Masing-masing daerah endemis berbeda-beda tergantung hasil penelitian di daerah tersebut. Kebanyakan berpendapat bahwa titer O 320 sudah menyokong kuat diagnosis demam tifoid.

Hal yang berbeda ketika pemeriksaan kultur darah dilakukan. Meskipun titer O dan H paling banyak ditemukan 316 orang (86,1%) dan 304 orang (82,8%) hasil kultur darah menunjukkan hanya 32 kultur yang positif. Pada kultur yang positif tersebut, terdapat 30 (8,2%) kultur positif *Salmonella typhi* dan 2 (0,5%) kultur positif *Salmonella paratyphi*. Beberapa referensi menunjukkan pemeriksaan widal memiliki sensitivitas dan spesifitas yang rendah. Pang, 1983 menyebutkan beberapa faktor mempengaruhi sensitivitas dan spesifitas tersebut. Standarisasi antigen terutama daerah endemik demam tifoid, adanya antigen yang sama pada

sesama salmonella, pengaruh antibiotik dan pemberian vaksin sebelumnya. Kultur darah dikatakan spesifik tetapi sensitivitasnya rendah. Beberapa faktor penyebab rendahnya sensitivitas ini adalah waktu pengambilan sampel dimana sirkulasi bakteri ini biasanya terjadi diminggu awal demam, volume darah yang tidak cukup untuk mengambil sejumlah bakteri dari darah, jenis media dan pengaruh antibiotik yang digunakan sebelum mendatangi fasilitas kesehatan. Penelitian oleh Antillon *et al.*, 2018 menyebutkan adanya kenaikan sensitivitas pada tiap jumlah sampel darah yang berbeda. Penelitian tersebut mengindikasikan adanya hubungan antara volume sampel dengan sensitivitas.

Pada pemeriksaan molekuler dengan PCR, terdapat 27 (90%) dari 30 kultur darah positif *S. typhi* dinyatakan positif. Pada sistem PCR, target DNA diamplifikasi dengan seperangkat primer. Song *et al.*, 1993 menyebutkan amplifikasi DNA *S. typhi* didasarkan region VI gen flagelin dimana pada region ini terdapat urutan nukleotida yang spesifik sehingga dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi *S. typhi*. Hasil pengujian menunjukkan, spesifitas amplifikasinya adalah 100% dan sensitivitasnya adalah 10 bakteri/ml. Demikian pula yang dilaporkan oleh Haque *et al.*, 2001 yang menyebutkan bahwa spesifitas PCR dalam mendeteksi *S. typhi* berdasarkan region VI gen flagelin adalah 100%. Prakash *et al.*, 2005 bahkan menyatakan berdasarkan hasil evaluasi yang dilakukan, PCR berdasarkan region tersebut disarankan dijadikan sebagai *gold standard* dalam pemeriksaan *S. typhi*. Pada penelitian ini, hasil positif ditunjukkan

dengan adanya pita DNA *S. typhi* yang muncul pada hasil elektroforesis dengan ukuran 458 pasangan basa.

2. Sensitivitas antibiotik pada *S. typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan uji sensitivitas antimikroba

Berdasarkan Pedoman Pengendalian Demam Tifoid, 2006, antimikroba segera diberikan bila diagnosis telah dibuat dan antimikroba yang diberikan sebagai terapi awal adalah dari kelompok antimikroba lini pertama untuk tifoid. Kelompok antimikroba lini pertama untuk tifoid adalah: Kloramfenikol, Ampisilin atau Amoxicilin, dan Trimetroprim-Sulfametoksazol sementara kelompok lini kedua Ceftriaxone, cefixime dan quinolone (KMK, 2006). Menurut *Indonesian Society of Tropical and Infectious Diseases Consultant Consensus 2010* mengenai demam tifoid, antibiotik yang digunakan untuk penanganan demam tifoid adalah Kloramfenikol, Ampisilin, atau Sulfametoksazol (Saragih and Purba, 2018). WHO, 2011 merekomendasikan hal serupa bahwa daerah yang bakteri *S typhi* masih sensitif, hendaknya menggunakan antibiotik lini pertama tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan antibiotik paling tinggi sensitifitasnya yaitu Sulphamethoxazole Trimethoprim (100%). Beberapa antibiotik yang lain seperti Ceftriaxone, Cloramphenicol, Cefepime dan Ofloxacin masing-masing 96,3%. Adapun Cefixime diketahui 88,9% sensitif terhadap antibiotik. Sensitifitas obat antibiotik paling rendah adalah Ampicillin yaitu 48,1% dan Amoxycilin yaitu 3,7%.

Kloramfenikol bekerja terhadap bakteri intra maupun ekstraseluler secara bakteristatik. Pada konsentrasi tinggi kadang-kadang bersifat bakterisidik terhadap bakteri tertentu (Mandal *et al.*, 2004). Mekanisme kerja antibiotik ini berupa penghambatan sintesis protein bakteri. Kloramfenikol menghambat enzim peptidil transferase yang berperan sebagai katalisator untuk membentuk ikatan-ikatan peptide pada proses sintesis protein bakteri. Pembentukan ikatan peptide akan terus dihambat selama obat tetap terikat pada ribosom. Antibiotik ini berikatan dengan subunit 50S dari ribosom dan akan mempengaruhi pengikatan asam amino yang baru pada rantai peptida karena kloramfenikol menghambat peptidil transferase.

Antibiotik Sulphamethoxazole Trimethoprim merupakan antibiotik yang terdiri atas Trimetoprim dan sulfonamid yang bersifat bakteristatik dengan modus aksi mempengaruhi metabolisme folat melalui penghambatan kompetitif biosintesis asam tetrahidrofolat. Sulfonamida menghambat *dihydropteroate synthetase* (DHPS), sementara Trimetoprim menghambat *dyhydrofolate reductase* (DFHR) (Mascaretti, 2003).

Ceftriaxone, Cefepime dan Cefixime merupakan antibiotik dari golongan Sefalosporin. Modus aksi antibiotik tersebut bersifat bakterisidal dengan cara menghambat sintesis dinding sel dengan merusak sintesis lapisan peptidoglikan bakteri. Antibiotik golongan ini memblokir transpeptidase yang berperan dalam pembentukan dinding sel bakteri.

Akibatnya dinding sel tidak sempurna sehingga mengakibatkan matinya bakteri.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik Sulphamethoxazole Trimethoprim, kloramfenikol dan beberapa antibiotik golongan selosporin seperti Ceftriaxone, Cefepime dan Cefixime dinyatakan masih sensitif dan digunakan dalam pengobatan demam tifoid. Lugito dan Cucunawangsih, 2017 menguraikan di dalam studinya bahwa sejak tahun 2001 hingga 2003, resistensi pada *S. typhi* masih rendah, bahkan tidak dijumpai resistensi pada trimethoprim-sulfamethoxazole, ceftriaxone, atau ciprofloxacin. Hal yang hampir sama dengan data pada tahun 2006 sampai 2010, tidak terjadi peningkatan kejadian resistensi antibiotik dari *S. typhi*. Kloramfenikol, ampisilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol, masih menunjukkan sensitifitas yang tinggi sehingga dapat dipakai sebagai terapi lini pertama demam tifoid. Antibiotik lini pertama (kloramfenikol, ampisilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol) 92–100%, seftriakson, sefotaksim, dan sefoperazon 95,7%–100%, seftazidim 81,8%–100%, meropenem 100%, imipenem 94,7%–100%, serta siprofloksasin 100%. Lugito dan Cucunawangsih menyimpulkan bahwa dari tahun 2011 hingga 2015 resistensi *S. typhi* dan *S. paratyphi* terhadap sejumlah antibiotik seperti ampisillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ceftriaxone, ciprofloxacin, and levofloxacin masih rendah.

Resistensi antibiotik diartikan sebagai kemampuan bakteri untuk menghentikan penghambatan atau pematian oleh antibiotik dimana pada awalnya bakteri tersebut sensitif dan efektif. Resistensi didefinisikan juga sebagai tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya (Tripathi, 2003).

Mekanisme resistensi antibiotik dapat dibedakan sebagai berikut :

a. Modifikasi atau destruksi antimikroba, b. Pengeluaran antimikroba keluar sel melalui *efflux pumps*, c. Modifikasi atau pengubahan target antibiotik dan d. Penurunan permeabilitas membran sel (Abatcha *et al.*, 2014).

Pada hasil penelitian ditemukan beberapa antibiotik yang diketahui resisten terhadap *S. typhi* berdasarkan uji *disc diffusion*. Resistensi antibiotik paling tinggi adalah Amoxicillin yaitu 96,3%, kemudian Ampicillin 48,1 % (dari 27 *S. typhi* yang di uji *disc diffusion*). Kedua jenis antibiotik ini merupakan golongan Beta-laktam I (penisilin spectrum luas) bekerja dengan menghambat proses transpeptidasi sehingga mengaktifkan enzim autolitik terhadap dinding sel. Aktivasi tersebut akan menyebabkan lisisnya dinding sehingga sel bakteri mengalami kematian. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Indang dkk, 2013 menemukan adanya resistensi pada Amoxicillin dan Ampicillin. Menurut Indang dkk, ini diakibatkan karena secara empiris antibiotik golongan Penisilin merupakan jenis antibiotik yang paling sering

digunakan, karena sifat dari golongan antibiotik ini memiliki sifat spektrum yang luas, dengan toksisitas rendah.

Berdasarkan hasil tersebut, pemberian Amoxicillin dan Ampicillin pada penderita demam tifoid, perlu dipertimbangkan. Mengingat tingginya resistensi pada kedua antibiotik tersebut. Resistensi *Salmonella* pada Amoxicillin dan Ampicillin terjadi karena sekresi beta-lactamase yang menghidrolisis struktur cincin beta-laktam sehingga antibiotik tidak bekerja. Resistensi yang ditemukan dalam penelitian ini tidak hanya pada satu antibiotik tetapi lebih dari satu antibiotik. Jenis antibiotik tersebut antara lain Amoxycilin – Ampicillin yaitu 48%, kemudian Amoxycilin - Ampicillin - Cefixime, Amoxycilin – Cefixime, Amoxycilin – Cefixime-Ofloxacin, Amoxycilin – Cloramphenicol, Amoxycilin –Ceftriaxon, dan Amoxycilin –Cefepime masing-masing 3,7%.

3. Keberadaan gen resisten antibiotik melalui deteksi plasmid IncHi1 *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR

Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat terjadi karena akuisisi gen asing melalui plasmid dan mutasi pada kromosom. Plasmid merupakan molekul DNA yang kecil dan terpisah dari DNA kromosomal, sehingga kemudian disebut DNA ekstrakromosomal. Umumnya, bakteri menggunakan plasmid untuk beradaptasi dengan tekanan lingkungan dan plasmid diketahui memiliki kemampuan untuk bereplikasi secara independen.

Plasmid dari *Enterobacteriaceae* dikategorikan menjadi dua grup berdasarkan kemampuan atau ketidakmampuan plasmid bersama dalam sel bakteri. Plasmid dengan grup inkompabilitas (Inc) yang sama merupakan plasmid yang terhubung erat, dengan mekanisme replikasi dan fungsi plasmid yang hampir sama. Plasmid tersebut dinamakan *incompatibility group* (Inc) HI1 yang merupakan vektor penting dalam resistensi antibiotik pada *S. typhi*. Mekanisme resistensi antibiotik melalui plasmid ini terjadi dengan: inaktivasi obat dan mengurangi permeabilitas membran, modifikasi titik target dan efflux antibiotik. Holt *et al.*, 2011 menyebutkan bahwa plasmid IncHI1 dapat pindah dari kelompok *Enterobacteriaceae* dan kelompok bakteri gram negatif lainnya. Di alam plasmid IncHI1 dideteksi pada isolat *Salmonella enteric* dan *Escherichia coli*. Kestabilan plasmid dalam sel inang dipengaruhi oleh faktor genetik. Phan, 2009 menyebutkan, ada sejumlah gen pada kromosom inang yang berkaitan erat dengan kestabilan plasmid IncHI1 sebagai ko-eksistensi.

Plasmid IncHI1 merupakan vektor penting dalam resistensi antibiotik pada *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *typhi* dan *S. Paratyphi A*. Umumnya, resistensi terhadap antibiotik lini pertama dikode di plasmid. Beberapa antibiotik yang resisten via plasmid adalah Kloramfenikol, Ampicillin dan Ko-trimoxazol, streptomycin, sulfanomida, tetracyclin dan trimetoprim (Robertson *et al.*, 2002, Kariuki *et al.*, 2004, Holt *et al.*, 2007, Chiou *et al.*, 2014). Dapat dikatakan Plasmid IncHI1 selalu dikaitkan dengan MDR dimana gen blaTEM-1 terkait dengan

resistensi ampicillin, *catA1* terkait resistensi dengan chloramphenicol, *stkarA-strB* terkait dengan resistensi terhadap streptomycin, *sul1*, *sul2*, and *dfrA7* terkait resistensi pada sulfamethoxazole dan trimethoprim. Hampton *et al.*, 1998 dalam penelitiannya menyatakan *S. typhi* MDR membawa plasmid IncHI1 telah tersebar secara global. Meskipun demikian, pada penelitian ini tidak ditemukan adanya plasmid IncHI1. Tidak ditemukannya plasmid tersebut dapat disebabkan tidak adanya plasmid pada sel *S. typhi* yang diperiksa dengan PCR. Tidak terdeteksinya plasmid IncHI1 dapat juga disebabkan, gen-gen resisten dibawa oleh plasmid incompatibility yang lain (Mirza *et al.*, 2000). Penelitian yang dilakukan oleh Chiou *et al.*, 2014, mengungkapkan bahwa tidak semua isolat MDR yang diujinya membawa plasmid IncHI1.

4. Keberadaan gen *gyrA* terkait resisten pada fluoroquinolon pada *S.typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR

Quinolon merupakan salah satu antibiotik yang diberikan untuk mengatasi infeksi bakteri pada manusia. Quinolon bersifat bakterisidal, terutama aktif terhadap bakteri gram negatif. Target Quinolon adalah enzim DNA gyrase and topoisomerase IV. Enzim tersebut berperan penting dalam replikasi DNA dan proses transkripsi. Quinolon dibedakan menjadi empat generasi yaitu generasi pertama meliputi nalidixic acid dan cinoxacin, generasi kedua yaitu norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, dan levofloxacin, generasi ketiga yaitu sparfloxacin, gatifloxacin, dan grepafloxacin dan generasi keempat yaitu trovafloxacin, moxifloxacin

dan gemifloxacin (Andriole, 2004). Dalam pengobatan tifoid, quinolon termasuk antibiotik lini kedua (KMK, 2006).

Resistensi quinolon selalu dihubungkan melalui tiga mekanisme:

a. Mutasi kromosom yang menyebabkan perubahan target enzim dan afinitas pengikatan obat, b mutasi kromosom menyebabkan berkurangnya akumulasi obat akibat aktifitas efflux (Correia *et al.*, 2017). Hal serupa juga dijelaskan dalam Neu HC, Gootz TD. 1996, bahwa resistensi pada quinolon jenis baru umumnya terkait dengan mutasi kromosom dimana terjadi substitusi asam amino pada region subunit A DNA gyrase. Resistensi quinolon terjadi disebabkan adanya mutasi pada DNA gyrase subunit A atau B, berkurangnya permeabilitas membran pada bakteri gram negatif, atau aktifnya *efflux transporters*. Hasil analisis molekuler menunjukkan adanya mutasi pada beberapa gen pada *Quinolone Resistance-Determining Region* (QRDR). Afzal *et al.*, 2013 menyebutkan mutasi titik pada QRDR gen *gyrA* terdapat pada beberapa tempat. Terutama kodon yang mengkode serin pada posisi 83 dan apartat pada posisi 87. Terkait penelitian mengenai resistensi fluoroquinolon Ling *et al.*, 2003, melaporkan bahwa resistensi quinolon pada *salmonellae* disebabkan adanya mutasi pada *gyrA*. Jarang sekali dilaporkan adanya mutasi pada *gyrB* dan belum pernah pada gen *parC*. Hal serupa dikatakan oleh Muthu, 2016, bahwa resistensi pada quinolon umumnya karena mutasi pada gen yang mengkode DNA gyrase (*gyrA* dan *gyrB*) dan DNA

topoisomerase IV (parC dan parE). Namun pada jenis Salmonella, mutasi terkait quinolon umumnya pada gen gyrA.

Pada penelitian ini, ada satu penderita demam tifoid yang dinyatakan positif resisten pada antibiotik jenis quinolon (ofloxacin) melalui uji *disc diffusion*. Pemeriksaan PCR dengan deteksi gen gyrA menunjukkan adanya pita DNA yang merupakan produk amplifikasi dengan ukuran 347 bp pada hasil elektroforesis. Ling *et al.*, 2003 menyebutkan bahwa resistensi pada fluoroquinolon umumnya disebabkan karena adanya mutasi pada gen gyrA. Keberadaan produk amplifikasi dengan ukuran 347 bp menguatkan dugaan adanya resistensi quinolon karena uji *disc diffusion* secara fenotip menunjukkan positif resisten terhadap ofloxacin. Selain positif resisten ofloxacin, diketahui pula penderita demam tifoid tersebut resisten terhadap amoxicilin pada uji *disc diffusion*. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai mutasi pada gen gyrA mengingat penelitian sebelumnya ditemukan adanya mutasi gyrA pada 17 isolat strain *S.typhi* dari Surabaya. Ada 8 isolat diketahui resisten terhadap nalidixic acid dan ampicillin dan juga memiliki mutasi gyrA pada kodon 87. Penelitian ini adalah laporan pertama mengenai adanya resistensi terhadap fluoroquinolon pada *S. typhi* dengan mutasi gyrA di Indonesia (Yanagi *et al.*, 2009).

5. Keberadaan *S.typhi* dari penderita demam tifoid yang resisten antibiotik di Makassar berdasarkan teknik *simple-PCR* berdasarkan *S. typhi* MDR H58

Haplotype 58 atau disebut juga H58 merupakan strain *Salmonella typhi* yang *Multi Drug Resistant* (MDR) dan sekaligus *nalidixic acid resistance* (NaIR) yang mengarah berkurangnya sensitifitas antibiotik jenis *fluoroquinolon* (Rougmnagnac *et al.*, 2009), Pham Thanh *et al.*, 2013 menyebutkan hal yang sama bahwa H58 merupakan genotip tunggal *S. typhi* yang mendominasi penyebaran secara global.

Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan berbagai metode untuk mengidentifikasi H58 antara lain *whole-genome sequencing* (Holt *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 2015, Pham Thanh *et al.*, 2016, Park *et al.*, 2018), *genotyping* (Baker *et al.*, 2008), *SNP typing* (Kariuki *et al.*, 2010, Holt *et al.*, 2011, Chiou, *et al.*, 2014.), *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (Pham Thanh *et al.*, 2013). Metode-metode tersebut merupakan cara pemeriksaan yang membutuhkan biaya besar dan fasilitas laboratorium sebagaimana laboratorium biologi molekuler. Tentu saja ini sulit terutama bagi negara-negara berkembang seperti Indonesia. Dengan adanya pemeriksaan dengan *simple PCR*, maka diharapkan pemeriksaan secara molekuler yang memiliki sensitivitas dan spesifitas tinggi dapat dilakukan.

Pada penelitian ini, digunakan cara sederhana yaitu dengan menggunakan *simple PCR*. Pasangan primer yang digunakan mengamplifikasi DNA *S. typhi* dengan ukuran 993 bp. Letak 993 bp

tersebut berada pada region 1466586 hingga 1467578 pada CT18 (Accession : NC_003198.1) dengan gen ID : 1247498 yang disimbolkan dengan STY1507. Gen tersebut terkait dengan *protein coding* yang menghasilkan aminotransferase. Pada urutan 993 bp terdapat delesi penyebab mutasi pada H58. Murgia *et al.*, 2016 telah melakukan validasi mengenai 993 bp ini dan menyatakan spesifitasnya mencapai 100%. Keberadaan delesi pada 993 bp terdeteksi pada semua strain *S.typhi* H58 yang diuji dan tidak terdapat pada strain non-H58. Hal ini juga menguatkan bahwa delesi tersebut terkonservasi kuat pada *S.typhi* H58. Adapun urutan yang diamplifikasi tersebut adalah :

```

1 aataggcctc atcacgttcg ctatagccaa atacgccgtg ctcgatctgc tgatgcaatg
 61 ccgcctgaac ctctggcggg caggcaaaaat cgaaatcaga aaccacacac ggcagcagtt
121 ttccagcgcc gtcgccaaag tgacgctcaa taaatccca ctttacgcaa ccagtattgt
181 tgcacacett ctgcgccttg tgggaacatg gcgatatcaa atccatcaat gaaagcgtcc
241 agtccctggt tgatgctcag tccctgcatg atgacgccga ggaacaaggc aagtacgcag
301 gcgcttaaca ttaatgggat gacaggcttt ttgcgaattg cgccccacag tacgatcacc
361 ggcggcaaaa taagaacaat attaaaatgg tatagcgact ccagcgagtg gatgatgtcc
421 gtaacgcgct gcggcgtagc cacctcgccc agcatattac tgtgtccggc gataagataa
481 accacggcgg caagcaggaa acttggcagg gtcgtccaaa gtaaagtctg aatatgtca
541 aacagagtag tgtctgcgac aatcgcgcca aagttagtcg agtcggacaa cggtagatt
601 ttgtcgccga aataagcgcg agaaacaacg gcgccagctg ctgctgcaag cgacacgtcc
661 agccccggcg caacccccat taacgcaacg ccaaccgtcc cggcgggacc ccacgatgta
721 ccggtacaga cggagaccac gctgggtaaa aagaaggctg caatcaaaat agatacgtag
781 ccccatgatg ccgtaaccga taatcaacaa taacaacatg gagatgactg ggattagcgc
841 taaacccaat gacagcgttt tcttctgtt ttgtgatgca ctcataatgg agctccggtc
901 agtaaggtag tagtattaca aaaagcatac agaatgaata tgttttattg atggaaaacg
961 ctttttctga aaaatataaa tatgcattta gaaatttaga actgaaagaa ttacgtagat
1021 tcattctgaa agagctaatt agctctcccg agttagataa tcaacttaca aacctaatcg
1081 tgttgctaaa taaattttgg gatactcagc ccgcgccgct tataacagaa gtgcggcgct
1141 ctaaagtta tcgattatta cttccgatc aacggtttg

```

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_003198.1)

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 13. terdapat 1 (3,7%) penderita demam tifoid yang positif memunculkan produk amplifikasi dengan ukuran 993 bp (slot 6). Hasil elektroforesis gel agarosa 2,5% urutan tersebut dapat dilihat pada gambar 14. Sampel DNA *S. typhi* pada slot 6,

diketahui juga positif memunculkan produk amplifikasi dengan ukuran 347 bp. Hal ini berarti pada slot 6, *S. typhi* tersebut positif memiliki gen *gyrA* dan gen yang mengarah ke H58. Secara fenotip (berdasarkan uji *disc diffusion*) pada slot 6 diketahui resisten terhadap ofloxacin, antibiotik golongan quionolon dan juga amoxicilin, antibiotik golongan penisilin spektrum luas. Data sampel hasil uji *disc diffusion* dan hasil uji PCR gen *gyrA* dan H58, dapat dilihat pada lampiran 3.

Hampir seluruh penelitian sebelumnya menyimpulkan bahwa gen-gen resisten yang paling umum terdeteksi pada H58 adalah *blaTEM-1* (resisten terhadap ampisilin), *dfrA7*, *sul1* dan *sul2* (resisten terhadap trimethoprim dan sulfonamida), *catA1* (resisten terhadap kloramfenikol) dan *strAB* (resisten terhadap streptomisin) dan gen-gen tersebut ditemukan pada isolat H58. Selain MDR, H58 tersebut juga selalu dikaitkan dengan keberadaan gen *gyrA*, penyebab berkurangnya sensitivitas bakteri terhadap antibiotik golongan fluoroquinolon (Chau, T.T et al., 2007, Roumagnac et al., 2006, Wong et al., 2015, Pham Thanh, et al., 2016).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Berdasarkan sensitivitas antibiotik pada *S.typhi* penderita demam tifoid di Makassar, terdapat antibiotik yang paling rendah sensitivitasnya yaitu Ampicillin dan Amoxycilin. sensitivitas beberapa antibiotik masih tinggi terutama Sulphamethoxazole Trimethoprim, Ceftriaxone, Cloramphenicol, Cefepime, cefixime, dan Ofloxacin. Ini dapat berarti antibiotik tersebut masih dapat digunakan tetapi perlu mendapat perhatian mengingat beberapa jenis antibiotik telah mengalami resisten,
2. Tidak ditemukan adanya plasmid IncHi1 *S. typhi* dari penderita demam tifoid di Makassar dengan teknik PCR.
3. Terdapat 1 (satu) isolat *S. typhi* yang membawa gen *gyrA* terkait resisten pada fluoroquinolon dari 27 isolat *S. typhi* penderita demam tifoid di Makassar berdasarkan teknik PCR. Hal ini ditunjukkan dengan adanya produk amplifikasi dengan ukuran DNA dengan ukuran 347 bp pada hasil elektroforesis
4. Terdapat 1 (satu) isolat *S. typhi* dari 27 isolat *S. typhi* penderita demam tifoid di Makassar yang positif memunculkan produk amplifikasi dengan ukuran 993 bp berdasarkan teknik *simple-PCR*.

produk amplifikasi dengan ukuran 993 bp tersebut mengindikasikan adanya H58 yang keberadaannya perlu diwaspadai.

B. Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan terkait pemeriksaan gen-gen resisten untuk mengkonfirmasi resistensi berdasarkan uji kepekaan antimikroba mengingat adanya resistensi pada beberapa antibiotik, terutama antibiotik yang resistensinya tinggi
2. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai mutasi pada gen *gyrA*, terkait kodon yang mengalami mutasi
3. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai H58, terkait delesi pada 993 bp melalui metode genotyping atau dengan SNP untuk mengetahui haplotype *S. typhi* secara lebih terperinci di Makassar

DAFTAR PUSTAKA

- Abatcha M. G., Z. Zakaria, D. G. Kaur and K. L. Thong. 2014. A trends of Salmonella and antibiotic resistance. *Review Article, Advances in Life Science and Technology*, Vol. 17.
- Adzitey F. 2015. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. *World's Vet. J.* 5(3): 36-41.
- Afzal A, Yasra S, Aamir, Abbas M, Muhammad Salman, Muhammad Asif H, Abdul Haque, 2013. Molecular evaluation of drug resistance in clinical isolates of Salmonella enterica serovar Typhi from Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries* 7(12):929-940, DOI: 10.3855/jidc.3154
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574.
- Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future, *Clinical Infectious Diseases*, 2005.41, S113–9
- Antillon M., Neil J. Saad, Stephen Baker, Andrew J. Pollard, and Virginia E. Pitze, 2018. The Relationship Between Blood Sample Volume and Diagnostic Sensitivity of Blood Culture for Typhoid and Paratyphoid Fever: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*® 2018;218(S4):S255–67
- Baker S and Dougan G. 2007. The Genome of Salmonella Serovar Typhi. Supplement Article: *Clinical Infectious Diseases*, 45:S29-33.
- Baker S, Holt K, van de Vosse E, Roumagnac P, Whitehead S, King E, Ewels P, Keniry A, Weill FX, Lightfoot D, van Dissel JT, Sanderson KE, Farrar J, Achtman M, Deloukas P, Dougan G. High-throughput genotyping of Salmonella enterica serovar Typhi allowing geographical assignment of haplotypes and pathotypes within an urban District of Jakarta, Indonesia. *J Clin Microbiol.* 2008 May;46(5):1741-6. doi: 10.1128/JCM.02249-07. Epub 2008 Mar 5. PMID: 18322069; PMCID: PMC2395080.
- Bergey, D.H. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. 8. Royal and Guilford Aveys Balvimore. USA. hal. 9.

- Boom, R. C.J.A., 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acid. *The Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology*. 1990. Vol. 28 No.3.
- Buckle C. Geoffery, Christa L. Fischer Walker, Robert E. Black, 2010. Typhoid Fever and paratyphoid Fever: Sistemic review to estimate morbidity and mortility for 2010. *J. Global Health*. 2010, 2(1):010401.
- Carattoli Alessandra, 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Review Article. Vet. Res.* 32 (2001) 243–259
- Chau TT, Campbell JI, Galindo CM, et al. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhi in asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4315–4323. doi:10.1128/AAC.00294-07
- Chen, S., Zhao, S. H., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H. C., et al. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1–7.
- Chin, James. 2012. Manual Pemberantasan Penyakit Menular. Penerjemah: I Nyoman Kandun. Jakarta: CV.Informatika
- Chiou Chien-Shun, Tsai-Ling Lauderdate, Dac Cam Phung, Haruo Watanabe, Jung-Che Kuo, Pei-Jen Wang, Yen-Yi Liu, Shiu-Yun Liang, Pei-Chen Chen, 2014. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enteric* Serovar Typhi Isolates from Bangladesh, Indonesia, Taiwan and Vietnam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.6501-6507.
- Chopra, I., and Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology Molecular Biology Review*, 65:232–260.
- Crump, J.A & Mintz E.D. 2010. Global Trends In Typhoid and Para Typhoid Fever. *Clin. Infect. Dis.* 50, 241-246.
- Crosa, J. H., D. J. Brenner, W. H. Ewing, and S. Falkow. 1973. Molecular Relationships Among The Salmonelleae. *Journal Of Bacteriology*, Vol. 115, No. 1.
- Correia S, Patrícia Poeta, Michel Hebraud, Jose Luis Capelo and Gilberto Igrejas 2017. Mechanisms of quinolone action and

resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 2017;66:551–559 DOI 10.1099/jmm.0.000475

Deng Yang, Xuerui Bao¹, Lili Ji¹, Lei Chen, Junyan Liu, Jian Miao, Dingqiang Chen, Huawei Bian, Yanmei Li and Guangchao Yu. 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons: A review, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14:45

Deng Wen, Shian-Ren Liou, Guy plunkett III, George F. Mayhew, Debra J. Rose, Valerie Burland, Voula Kodoyianni, David C Schwartz, and Frederick R. Baltner. 2003. Comparative Genomic of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty2 and CT18. *Journal Bacteriology*, Vol. 185, No. 7. p.2230-2337.

Dieffenbach, W.C. and Gabriella, S.D. 1995. *PCR Primer : A Laboratory Manual*. Spring Harbour Laboratory Press : USA

Duthie, R. and GL. Franch. 1990. Comparison of Methods for Diagnosis of Typhoid Fever. *J. Clin. Pathol*, 1990, 43:863-865

Dyson ZA, Klemm EJ, Palmer S, Dougan G. Antibiotic Resistance and Typhoid. *Clin Infect Dis*. 2019 Mar 7;68(Supplement_2):S165-S170. doi: 10.1093/cid/ciy1111. PMID: 30845331; PMCID: PMC6405283.

Etebu E. and Ariekpar I. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR* 4 (2016) 90-101

Ezaki, TY. Kawamura and E. Yabuuchi. 2000. Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets enteritidis and typhimurium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50, 945–947

Farmakope Indonesia, 1995, Edisi IV Departeman Kesehatan Republik Indonesia

Gabant *et al.*, 1993. Isolation and Location on the R27 Map of Two Replicons and Incompatibility Determinant Specific for IncHi1 Plasmids. *Journal of Bacteriology*, Vol, 175 No. 23

Ganiswara, G.G., Rianto, S., Frans D.S., Purwastyastuti. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke 4, UI Press: Jakarta.

- Grimont A.D. Patrick and François-Xavier Weill. 2007. Antigenic Formulae of The Salmonella Serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 9th edition.
- Grossman, D A (DA); Witham, N D (ND); Burr, D H (DH); Lesman4 M (M); Rubin, F A (FA); Schoolnih G K (GK); Parsonnet, J (i). 1995. Flagellar serotypes of Salmonella typhi in Indonesia: relationships among motility, invasiveness, and clinical illness. The Journal of infectious diseases (J Infect Dis). United States. (I7I):212-216
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. and Mendoza, M. C. 2002. Characterization of a self transferable plasmid from Salmonella enterica serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene 28 cassettes together with virulence and drug resistance genes. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 46:2977-2981.
- Hampton, M. D., Ward, L. R., Rowe, B., & Threlfall, E. J. (1998). Molecular fingerprinting of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhi. Emerging infectious diseases, 4(2), 317–320. doi:10.3201/eid0402.980223
- Harriet Ugboko and Nandita De. Mechanisms of Antibiotic resistance in Salmnolla typhi. Int.J. Curr.Microbiol.App.Sci (2014) 3 (12): 461-476 (2014).
- Hashimoto Y, Yoshihiro Itho, Youske Fujinaga, Abdul Quayum Khan, Ferdousi Sultana, Masaki Miyake, Kenji Hirose, Hiroyuki Yamamoto, and Takayuki Ezaki. 1995. Development of Nested PCR Based on the ViaB Sequence To Detect Salmonella typhi. Journal Of Clinical Microbiology, Mar. 1995, p. 775–777 Vol. 33, No. 3
- Hatta, M dan Ratnawati, 2008. Enteric Fever in endemic areas of Indonesia: an Increasing problem of resistance. J infect Developing Countries, 2(4): 279-282.
- Hatta, M. 2001. Teknik Isolasi dan Pengukuran Konsentrasi DNA. Makalah kursus Biologi Molekuler Bagi Tenaga Akademik Perguruan Tinggi Kawasan Timur Indonesia, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Haque, A., Naeem, A., Anwar P., Abida,R.,Samina., Ghulam, A. 2001. Utility of PCR in Diagnosis of Problematic Cases of Thypoid. Japanese Infectious Diseases J. 54:237-239.

- Hirose K, Ai Hashimoto, Kazumichi Tamura, Yoshiaki Kawamura, Takayuki Ezaki, Hiroko Sagara, Dan Haruo Watanabe, 2002. DNA Sequence Analysis of DNA Gyrase and DNA Topoisomerase IV Quinolone Resistance-Determining Regions of *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Serovar Paratyphi A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 3249–3252
- Holt E. Kathryn, Julian Parkhill, Camila J Mazzoni, Philippe Roumagnac, Francois-Xavier Weill, Ian Goodhead, Ricahrd Cance, Stephen Baker, Duncan J Maskell, John Wain, Christian Dolecek, Mark Achtman and Gordon Dougan. 2008. High Troughput Sequencing Provides Insights into genome variation and evolution in *Samonella typhi*. *Nature Genetics*. Vol.40.No. 8
- Holt E. Kathryn, Minh Duy Phan, Stephen Baker, Pham Thanh Duy, Tran Vu Thie Nga, Satheesh Nair, A. Keith Turner, Ciara Walsh, Seamus Fanning, Sinead Farrell Ward, shanta Dutta, Sam Kariuki, Francois Xavier Weill, Julian Purkhill, Gordon Dougan, John Wain. 2011. Emergence of a Globally Dominant IncHI1 Plasmid type Associated With Multi Drug Resistant Typhoid. *Plos Negl. Trop. Dis.* 5, e1245.
- Hooper D.C. and George A. Jacoby. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 September ; 1354(1): 12–31. doi:10.1111/nyas.12830.
- Indang Nur, Musjaya M.Guli dan Muhammad Alwi,2013. Uji Resistensi dan Sensitivitas Bakteri *Salmonella thypi* Pada Orang Yang Sudah Pernah Menderita Demam Tifoid Terhadap Antibiotik. *Jurnal Bi°C elebes* Vol. 7 No. 1, Juni 2013, ISSN: 1978-6417
- Jawetz *et al.* 2013. *Medical Microbiology*. Twenty-Sixth Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Joklik, WK., HP. Willett, DB. Amos and CM. Wilfert. 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th ed. Appleton and Lange Norwalk, Co. San Mateo California.
- Jorgensen James and Ferraro Jane Mary, *Antimicrobial susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices Clinical Infectious Diseases* 1998; 26:973 – 80
- Jorgensen JH dan Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing : a review of general principles and contemporary practices. *Medical microbiology*. 49:1749-5

- Kado, C.I., and S.T. Liu. 1981. Rapid Procedure for detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1337
- Kariuki S, Gunturu Revathi, Jane Muyodi, Joyce Mwituria, Agnes Munyalo, Sajjad Mirza and C. Anthony Hart. 2004. Characterization of Multidrug-Resistant Typhoid Outbreaks in Kenya. *Journal Of Clinical Microbiology.* p. 1477–1482 Vol. 42, No. 4
- Kariuki, S., Gunturu R, John K, Doris M. M, Joyce M, Jane M, Agnes M, Yik Y. Teo, Holt E Kathryn, Robert A. K, Gordon D., 2010. Typhoid in Kenya Is Associated with a Dominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi Haplotype That Is Also Widespread in Southeast Asia. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2010, p. 2171–2176 Vol. 48, No. 6. doi:10.1128/JCM.01983-09
- Kaur, J, and Jain, S.K. 2011. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research* 167 (2012) 199–210
- Kendrew, J. 1994. *The Encyclopedia of Molecular Biology.* Black Well Science Ltd. Oxford.
- Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 365/MENKES/SK/V/2006 tentang Pedoman Pengendalian Demam Tifoid
- Lambert P. 2004. Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology.* 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 212-219
- Levy B. Stuart 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American.* 278(3):46-53
- Levy, D. D., Sharma, B. and. Cebula, T. A. 2004. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48:2355-2363
- Ling JM, Chan EW, Lam AW, Cheng AF. 2003. Mutations in Topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant *Salmonellae* in Hongkong. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47(11): 3567-3573

- Lugito N P H and Cucunawangsih, 2017. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi isolates from a general hospital in Karawaci, Tangerang, Indonesia: A five-year review *Int. J. Microbiol.* 2017 Article ID 6215136
- Mandal, S.M.D.Mandal, N.K., Pal. 2004. Reduced Minimum Inhibitory Concentration of Chloramphenicol for *Salmonella enterica* serovar typhi. *Indian of Medical Science J.* 2004, 58(1):16-3
- Maurice, J. 2012. World Report : A first step in bringing typhoid fever out of the closet. www.thelancet.com Vol 379 February 25, 2012
- Mascaretti, O. A. (2003). *Bacteria Versus Antimicrobial Agents: An Integrated Approach.* ASM Press, Washington, DC.
- Misra *et al.*, 2016. Antimicrobial susceptibility pattern and sequence analysis of DNA gyrase and DNA Topoisomeras IV in *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A isolates with decreased susceptibility to Ciprol^oC xacin. *Royal Society of Tropical Medicine Hygene* 2016; 110:472-479
- Mirza S., S. Kariuki, K.Z. Mamun, N.J. Beeching, and C.A. Hart. 2000. Analysis of Plasmid and Chromosomal DNA of Multidrug-Resistant salmonella enterica serovar typhi from Asia. *J Clinical Microbiology*, 2000, Vol. 38, No. 4. p.1449-1452.
- Mullis B. Kary. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*.
- Muthu,G., Elumalai, S., Arumugam, S., Durairajpandian, V., Kannan, M. A., Selvam, E., & Seetharaman, S. 2016. GyrA ser 83 and ParC trp106 Mutations in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolated from Typhoid Fever Patients in Tertiary Care Hospital. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(7), DC14–DC18. doi:10.7860/JCDR/2016/17677.8153
- Neu HC, Gootz TD. 1996. *Medical Microbiology. Antimicrobial chemotherapy.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Olarte, J. and Emma, G. 1973. *SalmonellaTyphi* Resistant to Chloramphenicol, Ampcilin and Other Antimicrobial Agents: Strains Isolated During an Extensive Typhoid Fever Epidemic in Mexico. *Antimicrob. Agents Chemotherapy J.* 1973, 4 : 597-601
- O'Leary, M. William. 1989. *Practical Handbook of Microbiology.* Cummings Pub. Company Inc.USA

- Olliver, A., Valle, M., Chaslus-Dancla, E. and Cloeckert, A. 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:289-301.
- Ong, S. Y., Pratap, C. B., Wan, X., Hou, S., Rahman, A. Y. A., Saito, J. A. and Alam, M. (2013). The genomic blueprint of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi Pstx-12. *Standards in genomic sciences*, 7: 483-496
- Pang T, Puthuchery SD. Significance and value of the Widal test in the diagnosis of typhoid fever in an endemic area. *J Clin Pathol*. 1983 Apr;36(4):471-5. doi: 10.1136/jcp.36.4.471. PMID: 6833514; PMCID: PMC498248.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MT, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead Sand Barrell BG. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848-852
- Park, S. E., Pham, D. T., Boinett, C., Wong, V. K., Pak, G. D., Panzner, U., ... Baker, S. (2018). The phylogeography and incidence of multi-drug resistant typhoid fever in sub-Saharan Africa. *Nature communications*, 9(1), 5094. doi:10.1038/s41467-018-07370-z
- Petri, W. A. 2006. Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics, in Goodman & Gilman's, *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, eds L. L. Brunton, J. S. Lazo, and K. L. Parker (New York: The McGrawHill Companies), 1127–1154.
- Phan, Minh-Duy, and Wain John, 2008. Plasmid InCHI1: A dynamic Link Between Resistance and Pathogenicity. *J Infect Developing Countries*;2(4):272-278
- Phan, Minh-Duy, 2009. Analysis of InCHI1 Plasmid in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Darwin College, University of Cambridge.
- Pham Thanh, D., Tran Vu Thieu, N., Tran Thuy, C., Lodén, M., Tuin, K., Campbell, J. I., ... Baker, S. (2013). Identification of *Salmonella*

enterica serovar Typhi genotypes by use of rapid multiplex ligation-dependent probe amplification. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2950–2958. doi:10.1128/JCM.01010-13

Pham Thanh, D., Karkey, A., Dongol, S., Ho Thi, N., Thompson, C. N., Rabaa, M. A., ... Baker, S. (2016). A novel ciprofloxacin-resistant subclade of H58 Salmonella Typhi is associated with fluoroquinolone treatment failure. *eLife*, 5, e14003. doi:10.7554/eLife.14003

Prakash, P., Om, P.M. lok, S. Anil, K.G and Gopal, N. 2005. Evaluation of Nested PCR in Diagnosis of typhoid fever. *Clinical Microbiology J.* 2005, 43(1): 431-432

Praseno, 1989, Epidemiologi dan genetika Resistensi Bakteri terhadap Antibiotika, *Medika*, 15(11): 984990.

Prescott L.M, J.P Harley and Donal A. K. 2005. *Microbiology*. Sixth Ed. The Mc Graw Hill Co. Inc., New York.

Profil Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan 2014. Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan, 2015

Rougmnagnac Philippe, Francois Xavier Weill, Christiane Dolecek, Stephen Baker, Sylvain Brisse, Nguyen Tran Chinh, Thi Anh Hong Le, Camillo J. Acosta, Jeremy Farrar, Gordon Dougan, Mark Achtman, 2006. Evolutionary History of Salmonella typhi. *Science*, 24; 314(5803): 1301-1304.

Russell A. D. 2004. Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 152-186.

Robertson M, F., M. E. Addy, P. Mensah, and S. S. Crupper. 2002. Molecular characterization of antibiotic resistance in clinical Salmonella typhi isolated in Ghana. *FEMS Microbiol. Lett.* 215:249–253

Rychlik, I. D. Gregorova, H. Hradecka, 2006. Distribution and function of plasmids In Salmonella enterica, *Elsevier Veterinary Microbiology* 112 (2006) 1–10

Sande AS, Kapusnik-Uner JE, dan Mandell GL. 1990. Antimicrobial Agents, General Considerations. Dalam : Gilman AG, Rall TW, Nies AS, dan Taylor P (Eds), *Goodman and Gilman's The*

Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1018 – 1046.

Saragih, R H and G C F Purba, 2018. Antimicrobial resistance problems in typhoid fever. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Paper. Sci.12501209

Schleif, Robert, 1986. Genetics and molecular biology Cummings Pub. Company, Inc.: USA

Selander O.R, Pilar Beltran, Noel H. Smith, Reiner Helmuth, Fran A. Rubin, Dennis J. Kopecko, Kathleen Ferris, Ben D. Tall, S Alejandro Cravioto, And James M. Musse. 1990. Evolutionary Genetic Relationships of Clones of Salmonella Serovars That Cause Human Typhoid and Other Enteric Fevers. Infection and Immunity Vol.58, No.7. p.2262-2275.

Shaw, K. J., Rather, P. N. Hare, R. S. and Miller, G. H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiology Review, 57:138-163.

Sherburne CK, Lawley TD, Gilmour MW, Blattner FR, Burland V, Grotbeck E, Rose DJ and Taylor DE. 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from Salmonella typhi that is temperature sensitive for transfer. Nucleic Acids Res 28: 177-186

Smith, A. 2004. Bacterial resistance to antibiotics In: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 220-232.

Song, J.H, Helen, C., Y.P. Doe, S.N. Hee, B.M and Chik, H.P. 1993. Detection of Salmonella typhi in the blood of Patient with Typhoid fever. Clinical Microbiology J. 1993, 31 (16) 1439-1443.

Talaro, K.P., 2002. Foundations in Microbiology: Basic Principles. McGraw-Hill

Thong, Kwai-Lin, Savithri, P., Rohani, M.Y., Pratiwi, S., Maria, P., Eddy S. Indro, H., Suttipant, S., and Tikki, P. 1995. Analysis of Salmonella typhi Isolates from Southeast Asia by Pulses-Field Gel Electrophoresis. Clinical Microbiology J. 1995, 33(7) : 1938-1941.

- Tripathi, KD.2009. Essentials of Medical Pharmacology. Sixth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd
- John Wain, Nguyen T. T. Hoa, Nguyen T. Chinh, Ha Vinh, Martin J. Everett, To S. Diep, Nicholas P. J. Day, Tom Solomon, Nicholas J. White, Laura J. V. Piddock, Christopher M. Parry, Quinolone-Resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: Molecular Basis of Resistance and Clinical Response to Treatment, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 25, Issue 6, December 1997, Pages 1404–1410.
- Wain John, L. T. Diem Nga, Claire Kidgell, Keith James, Sarah Fortune, To Song Diep, Tahir Ali, Peadar O Gaora, Christopher Parry, Julian Parkhill, Jeremy Farrar, Nicholas J. White, And Gordon Dougan. 2003. Molecular Analysis of *intH1* Antimicrobial Resistance Plasmids from *Salmonella* Serovar Typhi Strains Associated with Typhoid Fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2732-2739 Vol. 47, No. 9 (2003).
- Wain, J., Rene S. Hendrikson, Matthew L. Mikoleit, Karen H Keddy, R Leon Ochiai, 2014. Typhoid Fever. *Lancet* 2015, 385:1136-45
- Watimena, R.J., Nelly, C.S., Mathilda B.W., Elin, Y.S. Andreanus, A.S., dan Anna, R. S. 1987. *Farmakodinami dan Terapi antibiotik*. Gadjah Mada University Press; Yogyakarta.
- Wong VK, Baker S, Pickard DJ, Parkhill J, Page AJ, Feasey NA, Kingsley RA, Thomson NR, Keane JA, Weill FX, Edwards DJ, Hawkey J, Harris SR, Mather AE, Cain AK, Hadfield J, Hart PJ, Thieu NT, Klemm EJ, Glinos DA, Breiman RF, Watson CH, Kariuki S, Gordon MA, Heyderman RS, Okoro C, Jacobs J, Lunguya O, Edmunds WJ, Msefula C, Chabalgoity JA, Kama M, Jenkins K, Dutta S, Marks F, Campos J, Thompson C, Obaro S, MacLennan CA, Dolecek C, Keddy KH, Smith AM, Parry CM, Karkey A, Mulholland EK, Campbell JI, Dongol S, Basnyat B, Dufour M, Bandaranayake D, Naseri TT, Singh SP, Hatta M, Newton P, Onsare RS, Isaia L, Dance D, Davong V, Thwaites G, Wijedoru L, Crump JA, De Pinna E, Nair S, Nilles EJ, Thanh DP, Turner P, Soeng S, Valcanis M, Powling J, Dimovski K, Hogg G, Farrar J, Holt KE, Dougan G. 2015. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella* Typhi identifies inter- and intracontinental transmission events. *Nat Genet.* 2015 Jun;47(6):632-9. doi: 10.1038/ng.3281. Epub 2015 May 11.

- Woolwine-Ciacchi, F, Blomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. 1998. Salmonella Flagellin Induce Tumor Necrosis Factor α In A Human Promonocytic Cell Line. *Infect Immune*. 66:1127-1134
- Wyant TL, Tanner MK, Sztein MB 1999, Salmonella typhi Flagella on antigenic stimulation of Human peripheral blood mononuclear. *Infect Immune*. 67-3619-3624
- Yanagi D, de Vries GC, Rahardjo D, Alimsardjono L, Wasito EB, De I, Kinoshita S, Hayashi Y, Hotta H, Osawa R, Kawabata M, Shirakawa T. 2009. Emergence of fluoroquinolone-resistant strains of Salmonella enterica in Surabaya, Indonesia. *Diagn Microbiol Infect Dis* Aug;64(4):422-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.006.
- Yuwono, T. 2005. Biologi Molekuler. Yogyakarta: Penerbit Erlangga
- Zhang XL, Jeza VT, Pan Q. 2008. Salmonella Typhi: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cell Mol Immunol*. Vol.5(2):9

LAMPIRAN 1. Rekomendasi Persetujuan Etik

LAMPIRAN 2. Data hasil kultur darah dan PCR-ST, PCR- gen gyrA gene dan PCR-58.

LAMPIRAN 2. Data hasil kultur darah dan PCR-ST, PCR- gen gyrA gene dan PCR-58.

Information of antibiotics sensitivity test, blood culture and PCR for ST confirmation, GyrA gene and H58 detection among isolates that were used in this study.

NO	LABORATORY NUMBER	ST BC	ST PCR	ANTIBIOTICS SENSITIVITY TEST (diameter zone in mm)								GyrA PCR	H58 PCR
				Amp ₁₀	Aml ₂₅	Sxt ₂₅	Cro ₃₀	Fep ₃₀	Cfm ₅	Ofx ₅	C ₃₀		
1	J59	P	P	17 ^S	12,4 ^R	31,9 ^S	32,4 ^S	32,4 ^S	34,8 ^S	29,3 ^S	30,5 ^S	N	N
2	J71	P	P	17 ^S	13,2 ^R	30 ^S	33 ^S	28,2 ^S	28,7 ^S	27,2 ^S	28,2 ^S	N	N
3	J72	P	P	13,5 ^R	11,1 ^R	28,4 ^S	28,6 ^S	30 ^S	32,6 ^S	25,2 ^S	27,9 ^S	N	N
4	J75	P	P	13,1 ^R	13,7 ^R	30,8 ^S	26,1 ^S	28 ^S	30,7 ^S	27,4 ^S	28,8 ^S	N	N
5	J76	P	P	13,8 ^R	13,2 ^R	32,5 ^S	34,6 ^S	30,4 ^S	27,6 ^S	29,4 ^S	34,4 ^S	N	N
6	J78	P	P	19,6 ^S	13,3 ^R	29,2 ^S	28,5 ^S	28,7 ^S	14,9 ^R	12,6 ^R	29,3 ^S	P	P
7	J80	P	P	13,2 ^R	12,6 ^R	29,3 ^S	28,2 ^S	26,2 ^S	27,2 ^S	27,4 ^S	29,6 ^S	N	N
8	J130	P	P	13,6 ^R	13,9 ^R	29 ^S	32 ^S	31,2 ^S	25,6 ^S	27,6 ^S	30,5 ^S	N	N
9	J134	P	P	18,2	13 ^R	35,4 ^S	12,5 ^R	32 ^S	33,4 ^S	30,4 ^S	31,7 ^S	N	N
10	J135	P	P	13,4 ^R	12 ^R	33,9 ^S	34 ^S	33,1 ^S	31,8 ^S	25,4 ^S	30,8 ^S	N	N
11	J140	P	P	18 ^S	13,6 ^R	31,6 ^S	35 ^S	32 ^S	31,8 ^S	30,2 ^S	30,4 ^S	N	N
12	J166	P	P	19,2 ^S	18,6 ^S	32,3 ^S	30,6 ^S	27,8 ^S	30 ^S	29 ^S	26 ^{SS}	N	N
13	J169	P	P	18,6 ^S	12,3 ^R	33,4 ^S	34 ^S	32 ^S	32,1 ^S	32,3 ^S	30,9 ^S	N	N
14	J174	P	P	17,2 ^S	13,3 ^R	32 ^S	36,6 ^S	31,3 ^S	25,2 ^S	30,9 ^S	12,8 ^R	N	N
15	J175	P	P	13,2 ^R	11 ^R	33,4 ^S	33,6 ^S	26,9 ^S	29,8 ^S	29,8 ^S	29,4 ^S	N	N
16	J183	P	P	13,4 ^R	13,1 ^R	33 ^S	35 ^S	31,4 ^S	27,9 ^S	28,8 ^S	29 ^S	N	N

NO	LABORATORY NUMBER	ST BC	ST PCR	ANTIBIOTICS SENSITIVITY TEST (diameter zone in mm)								GyrA PCR	H58 PCR
				Amp ₁₀	Aml ₂₅	Sxt ₂₅	Cr ₃₀	Fep ₃₀	Cfm ₅	Ofx ₅	C ₃₀		
17	J187	P	P	13,2 ^R	13,2 ^R	32,2 ^S	33 ^S	32,8 ^S	31,8 ^S	34 ^S	31 ^S	N	N
18	J190	P	P	17,1 ^S	13,6 ^R	31,8 ^S	36,4 ^S	31 ^S	15,6	30,5 ^S	28 ^S	N	N
19	J205	P	P	17,2 ^S	13,5 ^R	30,3 ^S	32,6 ^S	27,3 ^S	32 ^S	28,3 ^S	29,8 ^S	N	N
20	J222	P	P	13,6 ^R	12,1 ^R	30 ^S	31,2 ^S	26,9 ^S	15,2	26,4 ^S	29,4 ^S	N	N
21	J244	P	P	19,3 ^S	13,5 ^R	31,5 ^S	29,3 ^S	14	25,2 ^S	18,3 ^S	28 ^S	N	N
22	J264	P	P	17,7 ^S	13,7 ^R	34 ^S	36,3 ^S	29,4 ^S	28,4 ^S	33 ^S	32,8 ^S	N	N
23	J286	P	P	13,4 ^R	13,1 ^R	33,9 ^S	33,2 ^S	33,6 ^S	31,4 ^S	24,4 ^S	31,4	N	N
24	J293	P	P	13,3 ^R	15 ^R	33 ^S	33 ^S	28,6 ^S	26,8 ^S	30 ^S	31,2	N	N
25	J313	P	P	17,8 ^S	15,4 ^R	31,7 ^S	33,6 ^S	28,6 ^S	32,9 ^S	28,4 ^S	32,6	N	N
26	J315	P	P	13,7 ^R	14,7 ^R	30,5 ^S	33,2 ^S	29,3 ^S	33,2 ^S	30,2	30,6	N	N
27	J326	P	P	13,8 ^R	15,4 ^R	33,4 ^S	32,8 ^S	33,4 ^S	26,9 ^S	22,8	29,4	N	N

Abbreviations: ST, *Salmonella typhi*; BC, Blood culture; PCR, Polymerase Chain Reaction; amp, ampicillin; aml, amoxicillin; sxt, sulfamethoxazole-trimethoprim; cro, Ceftriaxon; fep, cepefime; cfm, cefixime; ofx, ofloxacin; c, chloramphenicol; S, sensitive; R, Resistant.

Lampiran 3. Hasil analisis SPSS

Lampiran 3. Hasil analisis SPSS

Statistics

Umur

N	Valid	367
	Missing	0
Mean		24.10
Minimum		17
Maximum		62

Statistics

Demam

N	Valid	367
	Missing	0
Mean		5.53
Minimum		4
Maximum		9

Demam

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	4	21	5.7	5.7	5.7
	5	207	56.4	56.4	62.1
	6	79	21.5	21.5	83.7
	7	45	12.3	12.3	95.9
	8	12	3.3	3.3	99.2
	9	3	.8	.8	100.0
Total		367	100.0	100.0	

Statistics

Suhu

N	Valid	367
	Missing	0
Mean		38.086
Minimum		37.8
Maximum		39.5

Suhu

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	37.8	16	4.4	4.4	4.4
	38.0	298	81.2	81.2	85.6
	38.5	37	10.1	10.1	95.6
	38.7	1	.3	.3	95.9
	39.0	13	3.5	3.5	99.5
	39.2	1	.3	.3	99.7
	39.5	1	.3	.3	100.0
	Total	367	100.0	100.0	0

Jenis Kelamin

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	laki-laki	147	40.1	40.1	40.1
	perempuan	220	59.9	59.9	100.0
Total		367	100.0	100.0	

Malaise

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Ya	367	100.0	100.0	100.0

Lidah kotor

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Ya	363	98.9	98.9	98.9
Tidak	4	1.1	1.1	100.0
Total	367	100.0	100.0	

Sakit Kepala

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ya	344	93.7	93.7	93.7
	Tidak	23	6.3	6.3	100.0
	Total	367	100.0	100.0	

Nafsu Makan Menurun

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ya	325	88.6	88.6	88.6
	Tidak	42	11.4	11.4	100.0
	Total	367	100.0	100.0	

Bradikardi Relatif

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ya	192	52.3	52.3	52.3
	Tidak	175	47.7	47.7	100.0
	Total	367	100.0	100.0	

Mual

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Tidak	367	100.0	100.0	100.0

Nyeri Otot

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Tidak	367	100.0	100.0	100.0

Widal O

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=160	20	5.4	5.4	5.4
	320	316	86.1	86.1	91.6
	>320	31	8.4	8.4	100.0
	Total	367	100.0	100.0	

Widal H

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=160	29	7.9	7.9	7.9
	320	304	82.8	82.8	90.7
	>320	34	9.3	9.3	100.0
	Total	367	100.0	100.0	

Frequency Table

ampH (Ampicillin)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	13	48.1	48.1	48.1
	Resisten	14	51.9	51.9	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

amlH (Amoxicilin)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	1	3.7	3.7	3.7
	Resisten	26	96.3	96.3	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

sxtH (Sulphamethoxazole Trimethoprim)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	27	100.0	100.0	100.0

croH (Ceftriaxone)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	26	96.3	96.3	96.3
	Resisten	1	3.7	3.7	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

fepH (Cefepime)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	26	96.3	96.3	96.3
	Resisten	1	3.7	3.7	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

cfmH (Cefixime)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	24	88.9	88.9	88.9
	Resisten	3	11.1	11.1	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

ofxH (Ofloxacin)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	26	96.3	96.3	96.3
	Resisten	1	3.7	3.7	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

cH (chloramdenicol)

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sensitif	26	96.3	96.3	96.3
	Resisten	1	3.7	3.7	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

resRES

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	11111111.00	1	3.7	3.7	3.7
	12111111.00	7	25.9	25.9	29.6
	12111112.00	1	3.7	3.7	33.3
	12111211.00	1	3.7	3.7	37.0
	12111221.00	1	3.7	3.7	40.7
	12112111.00	1	3.7	3.7	44.4
	12121111.00	1	3.7	3.7	48.1
	22111111.00	13	48.1	48.1	96.3
	22111211.00	1	3.7	3.7	100.0
	Total	27	100.0	100.0	

Frequency Table

Plasmid IncHI1

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	27	100.0	100.0	100.0

Gen GyrA

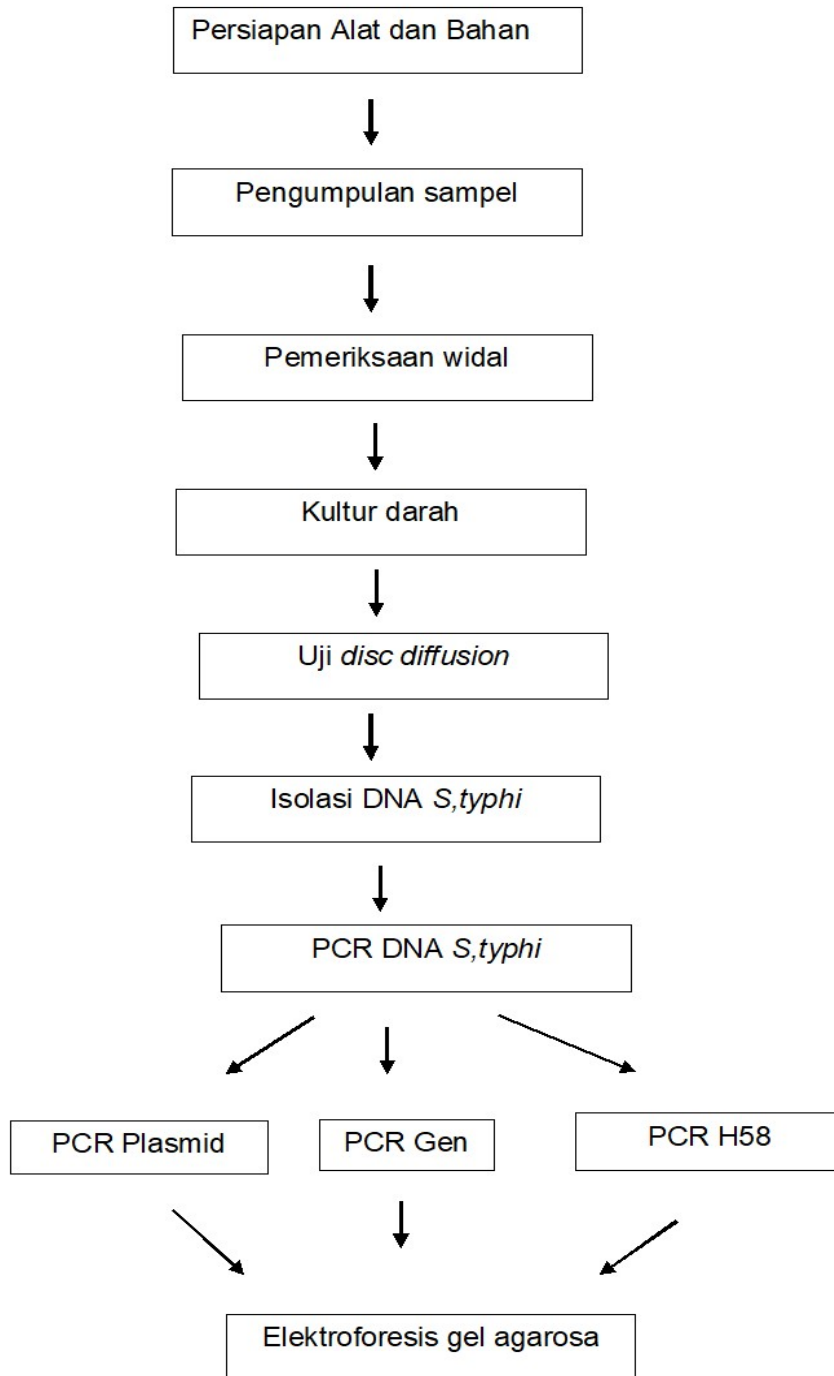
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	26	96.3	96.3	96.3
	2	1	3.7	3.7	100.0
Total		27	100.0	100.0	

Gen H58

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	26	96.3	96.3	96.3
	2	1	3.7	3.7	100.0
Total		27	100.0	100.0	

Lampiran 4. SKEMA KERJA

Lampiran 4. SKEMA KERJA



1. Kultur darah dan identifikasi

Darah penderita Demam tifoid



Medium Oxbile (35-37 °C, 24 Jam)



SSA (37 °C, 18-24 jam)



TSIA, SIM< MR-VP, Urea, Citrat dan Uji Biokimia (35-37 °C,, 18-24 jam)

2. Isolasi DNA

100 μ l kultur *S. typhi* +900 μ l buffer L6, Sentrifuse, 10 mnt



endapan + 20 μ l suspensi diatomea (celite).



campuran dihomogenkan gyrotori shaker, 100 rpm, 10 menit



Disentrifugasi, 12000 rpm selama 15 detik



Supernatan yang terbentuk dipisahkan dari endapan, vakum



endapan +1 ml buffer L2



Sentrifuse, 12.000 rpm, 15 detik, 2x, supernatant dibuang+ 1 ml etanol
70%



Sentrifuse, 12.000 rpm, 15 detik, supernatant diibuang, 2x



Endapan ditambahkan 1 ml aseton, sentrifuse 12.000 rpm, 15 detik



Inkubasi 56 °C, 10 menit



40 μ l buffer TE, vortex, inkubasi 56 °C, 10 menit



Suspensi disentrifugasi degan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik



40-50 μ l supernatan yang terbentuk

3. Isolasi Plasmid

Kultur S. typhi berumur 1 hari dalam BHI Broth ,1.5 ml di sentrifugasi 4000 RPM, 20 menit + 100µl larutan 1 (Tris HCl pH 7.5-8; 10 mM EDTA; 50mM Glukosa) divortex, didiamkan selama 5 menit



Ditambahkan 200 µl larutan 2 (0,2 N NaOH; 1% Sodium Dedosil Sulfat) dan dihomogenkan



tambahkan 150 µl larutan 3 (Kalium Acetat 3% pH 4,8) vortex, 10 detik. Tabung dibenamkan dalam es selama 5 menit lalu disentrifus



Supernatan ke tabung ependorf baru, + phenol dan kloroform (1:1) volume = supernatant yang didapat, vortex



Disentrifus selama 2 menit. Fasa air (fasa atas) dipindahkan dengan hati-hati ke dalam tabung ependorf baru 2x



Tambahkan 1 ml ethanol pa, vortex, benamkan dalam es selama 5 menit. Sentrifuse, 20 menit, kemudian buang supernatant



tambahkan 1 ml ethanol pa, campur dengan jalan membalik-balikkan tabung beberapa kali



Supernatan dibuang dan dikeringkan dalam oven 50 oC Resuspensi plasmid dalam 50 μ l TE (10 mM Tris pH7.4 atau 0.1211 g%; 1 mM EDTA pH 8 0.0372 g%).

4. PCR *Salmonella typhi*

PCR mix : 22,5 µl PCR mix (2,5 µl 10x buffer 10x, 0,5 µl Taq DNA polymerase, 2 µl MgCl₂, 2,5 µl dNTP, 15 µl aquades (ddH₂O), primer forward : (5'- ACTGCTAAAACGACTACT-3'), reverse: (5'- TTAACGCAGTAAAGAGAG -3') masing-masing 1 µl.



2 µl ekstrak DNA *S.typhi*



Amplifikasi: denaturasi awal 95 °C selama 10 menit, selanjutnya dilakukan sebanyak 35 siklus, dimana setiap siklus terdiri atas denaturasi 96 °C selama 30 detik, *annealing* 56°C selama 30 detik, *extension* pada suhu 70 °C selama 1 menit. Proses ini dilanjutkan dengan 72 °C selama 1 menit.

5. PCR Plasmid

PCR mix : 2,5 μ l 10x buffer (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin), 1 μ l primer IncHI1 forward : (5'-GGTCCAACCCATTGCTTTAC -3'), 1 μ l primer IncHI1 reverse: (5'-CACGGAAAGAAATCACAAC -3') 0,5 μ lTaq DNA polymerase, 2,5 μ l dNTP, 15 μ l aquades (ddH₂O)



+ 2,5 μ l ekstrak DNA sampel



amplifikasi 30 siklus : denaturasi Awal (94 °C,3 menit) kemudian setiap siklus : denaturasi (94 °C, 30 detik). Annealing (58 °C, 30 detik), extension (72 °C, 30 detik)

6. PCR gyrA

TMDreamTaq Green PCR Master Mix dengan total reaksi volume TM 50 μ l yang terdiri dari 25 μ l 2x DreamTaq Green PCR Master Mix, 1 μ l dari 1 μ M stok primer yang akan menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran 347 pb, (F, 5'-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3' dan R, 5'-TACCGTCATAGTTATCCACG -3')



tambahkan 2,5 μ l of DNA templat



Amplifikasi 35 siklus : denaturasi awal 95°C, 5 menit, denaturasi selanjutnya dengan tempertaur 94°C, 1 menit, annealing 52°C, 1 menit, dan ekstensi 72°C, 1 menit. Ektensi akhir 72°C, 5 menit.

7. PCR H58

PCR-mix : 22,5 μ l yaitu 2,5 μ l buffer PCR 10X, 0,5 μ l Taq polimerase, 2 μ l MgCl₂, 2 μ l dNTPs, 13,5 μ l aquadest, 1 μ l primer Forward (5'-AATAGGCCTCATCACGTTTCG-3') dan primer Reverse (5'-CAAACCGTTGAATCGGAAGT-3').



tambahkan 2,5 μ l of DNA templat



Amplifikasi denaturasi 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus :60 detik pada 94°C; 45 detik, 57°C; dan 60 detik, 72°C. Proses ini dilanjutkan dengan 72°C selama 2 menit

8. Elektroforesis gel agarosa

2,5 µl produk amplifikasi PCR dicampur dengan 2 µl larutan loading.



Campuran dipipet ke dalam sumur gel agarosa 2% dalam buffer TBE di tanki elektroforesis.



elektroforesis dijalankan 1 jam, tegangan konstan 75 volt.



gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil elektroforesis kemudian didokumentasikan dengan kamera.



- Hasil positif adanya *Salmonella typhi* = produk amplifikasi dengan ukuran 458 bp
- Hasil positif adanya plasmid IncHI1 = produk amplifikasi dengan ukuran 365 bp
- Hasil positif adanya gen gyrA = produk amplifikasi dengan ukuran 347 bp
- Hasil positif adanya H58 = produk amplifikasi dengan ukuran 993 bp