

**PROFIL MUTASI GEN *par E* ISOLAT *Salmonella typhi*
DI MAKASSAR YANG RESISTEN TERHADAP CIPROFLOKSASIN
BERDASARKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION***

PROFIL OF *par E* GENE MUTATIONS OF *Salmonella typhi*
FROM MAKASSAR RESISTENCE TO CIPROFLOXACIN BASED
ON *POLYMERASE CHAIN REACTION* TECHNIQUES

HUSAIN



PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Husain

Nomor Mahasiswa : P1503205005

Program Studi : Biomedik

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

Makassar,
Yang menyatakan

Husain

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas Berkat dan Karunai-Nya sehingga penyusunan tesis ini dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Magister pada Pascasarjana Universitas Hasanuddin di Makassar.

Tesis ini disusun berdasarkan penelitian di Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. dr. Danny Suwandi, Ph.D., Sp.FK dan Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK Sebagai Ketua dan Anggota Komisi Penasehat yang telah memberikan bimbingan kepada penulis mulai dari perencanaan penelitian, pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan tesis ini.
2. Prof. dr. Peter Kabo, Ph.D., Sp.FK, dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D., DR. dr. Burhanuddin Bahar, MS., yang telah memberikan bimbingan dalam penulisan tesis ini.
3. Prof. Dr. H. Abd. Razak Datu, Ph.D., dr. H. Djumadi Achmad, Sp.PA(K)., dr. Hj. St. Maisuri T. Chalid, Sp.OG(K)., dr. H. Djayalangkara Tanra, Ph.D, Sp.KJ., atas segala bantuannya.

4. Istriku, dr. Dwi Sukma Wahyuni, anakku Muh. Aqram Anwar, Ayahanda H. Bunaing, Ibunda Hj. Satta dan seluruh keluarga atas segala doa dan dukungannya.
5. Pak. Romi, Pak. Rusli, dan Pak Safri atas segala baturannya.
6. dr. Hj. Suliati P. Amir, Sp.M., dr. Asis Beru Gani., dr. Moch. Erwin Rahman., dr. Syamsu Rijal., dr. Hermiaty, M.Kes., seluruh dosen dan staf Fakultas Kedokteran UMI atas segala dukungannya.

Dengan segala keterbatasan penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu segala sumbang saran untuk perbaikan sangat diharapkan. Akhirnya dengan segala kerendahan hati penulis mempersembahkan tesis ini, dengan harapan dapat berguna bagi pembacanya.

Makassar, Agustus 2008

Penulis

ABSTRAK

HUSAIN. *Profil Mutasi Gen par E Isolat Salmonella typhi di Makassar yang Resisten Terhadap Ciprofloksasin Berdasarkan Teknik Polymerase Chain Reaction* (dibimbing oleh Danny Suwandi dan Mochammad Hatta)

Penelitian ini bertujuan (1) Menganalisis adanya mutasi pada gen *par E* dari *Salmonella typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin berdasarkan hasil pengujian metode PCR - RFLP, (2) Menentukan isolat *Salmonella typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofoksasin berdasarkan hasil pengujian metode *disc diffusion* dan teknik PCR.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Sampel diperoleh dari Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo Makassar. Pengujian sensitifitas *S. typhi* terhadap ciprofloksasin berdasarkan metode *disc diffusion* dan deteksi mutasi gen *par E* strain *S. typhi* isolat Makassar dengan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *Hinf I*. Data dianalisis berdasarkan zona hambatan, pola fragmen DNA setelah direstriksi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 8 dari 20 strain *S. typhi* resisten terhadap ciprofloksasin utamanya pada *par E*. Mutasi gen *par E* dari *S. typhi* menyebabkan untaian DNA tidak mengalami restriksi pada urutan GACTC. Perlunya dilakukan penelitian lanjut, terutama untuk sequencing dan menentukan asam amino yang mengalami mutasi isolat *S. typhi* Makassar yang resisten terhadap ciprofloksasin pada *par E*.

ABSTRACT

HUSAIN. *Profil of par E Gene Mutations of Salmonella typhi From Makassar Resistance to Ciprofloxacin Based on Polymerase Chain Reaction Techniques* (Supervised by Danny Suwandi and Mochammad Hatta)

The objective of this study were : (1) to analyze mutations of *par E* gene, which resistance and sensitive to ciprofloxacin based on PCR-RFLP methods, (2) to determine *S. typhi* isolate which resistance and sensitive to ciprofloxacin based on disc diffusion and PCR technique.

This study have been done in Immunology and Biology Molecular Laboratory, Medical Faculty of Hasanuddin University. Sampel was obtained from RS. Wahidin Sudirohusodo, Makassar. The study was done by testing the sensitifity of *S. typhi* to ciprofloxacin based on disc diffusion methods and detection *par E* gene mutations of *S. typhi* strains based on PCR-RFLP techniques by using *Hinf I* restriction enzymes. Data was analyzed based on inhibition zone, different of restricted DNA fragment.

Result of this study showed that 8 of 20 *S. typhi* strains resistant to ciprofloxacin. *par E* gene mutations of *S. typhi* caused DNA strands could not be restricted in GACTC sequences. Important to continue this study, specially for sequencing and to determine amino acid which mutation of *S. typhi* isolate Makassar resistance to ciprofloxacin in *par E*.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian	8
D. Manfaat Penelitian	8
E. Defenisi dan Istilah	9
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. <i>Salmonella typhi</i>	11
1. Morfologi dan Identifikasi	11
2. Klasifikasi	12
3. Patogenesis dan Tanda Klinis	14
4. Uji Laboratorium Diagnostik	15

5. Kekebalan	18
6. Pengobatan	18
7. Epidemiologi	20
8. Pencegahan dan Pengontrolan	22
B. Antimikroba	22
1. Pembuatan Antibiotika	22
2. Sifat Antimikroba	23
3. Mekanisme Kerja Antimikroba	24
4. Penggunaan Antimikroba di Klinik	26
C. Ciprofloksasin	29
1. Deskripsi	29
2. Farmakokinetik	30
3. Interaksi Obat	31
4. Spektrum Antibakteri	32
5. Mekanisme Kerja	33
6. Mekanisme Resistensi	33
7. Efek Samping	37
D. Resistensi Antibiotika	38
1. Pola Resistensi Antibiotika	38
2. Mekanisme Resistensi	38
3. Resistensi Mikroba Terhadap Antibiotika	40
E. Pengendalian Resistensi Obat	42

F. Implikasi Klinis Resistensi Obat	42
G. Pengujian Resistensi Antibiotika	43
H. Polymerase Chain Reaction	44
1. Teknologi PCR	45
2. Prinsip Teknik PCR	47
3. Komponen pada Proses PCR	50
4. Deteksi dan Analisa Hasil PCR	50
5. Macam-Macam PCR	51
6. Faktor-Faktor yang Menentukan Keberhasilan PCR	53
7. Manfaat Teknik PCR dalam Dunia Kesehatan	61
8. PCR – RFLP	62
9. Gen Bank – Posisi Primer dan Restriksi	63
I. Gen	63
1. Organisasi Gen	63
2. Mutasi Gen	65
3. Deteksi Mutasi Gen	65
J. Kerangka Konsep	67
K. Hipotesa	69
III. METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian	70
B. Waktu Penelitian	70
1. Waktu Penelitian	70

2. Lokasi Penelitian	70
C. Variabel Penelitian	70
D. Populasi dan Sampel	71
E. Bahan dan Alat Penelitian	71
1. Bahan Penelitian	71
2. Alat Penelitian	72
F. Cara Pengumpulan Data	73
G. Cara Kerja	73
1. Identifikasi <i>Salmonella typhi</i>	73
2. Uji sensitifitas <i>Salmonella typhi</i> terhadap ciprofloksasin	74
3. Uji PCR	75
H. Analisa Data	81
IV. HASIL PENELITIAN	
A. Hasil Penelitian	82
B. Pembahasan	91
V. PENUTUP	
A. Kesimpulan	99
B. Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	106

DAFTAR LAMPIRAN

nomor		halaman
1.	Skema Kerja	106
2.	Deteksi <i>Salmonella typhi</i> dengan teknik kultur	107
3.	Skema pengujian <i>disc diffusion</i>	108
4.	Isolasi DNA <i>Salmonella typhi</i> dengan metode Boom	109
5.	Proses amplifikasi PCR-RFLP	110

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
1. Data Sampel <i>S. typhi</i> yang sensitif terhadap ciprofloksasin berdasarkan metode <i>disc diffusion</i> .	82
2. Data hasil PCR-RFLP gen <i>par E</i> dari <i>S. typhi</i> yang sensitif terhadap ciprofloksasin.	83
3. Data mutasi gen <i>par E</i> dari <i>S. typhi</i> yang sensitif terhadap Ciprofloksasin.	84
4. Data Sampel <i>S. typhi</i> yang resisten terhadap ciprofloksasin berdasarkan metode <i>disc diffusion</i> .	85
5. Data hasil PCR-RFLP gen <i>par E</i> dari <i>S. typhi</i> yang resisten terhadap ciprofloksasin.	86
6. Data mutasi gen <i>par E</i> dari <i>S. typhi</i> yang resisten terhadap ciprofloksasin.	92
7. Hubungan antara Disc Diffuson dengan PCR – RFLP pada resistensi gen <i>par E S. Typhi</i> .	98

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam tifoid merupakan infeksi sistemik serius yang disebabkan oleh patogen *Salmonella entericaserovar Typhi* yang lazim disebut *Salmonella typhi*. Jika disebabkan serotype yang lain disebut demam paratifoid. Biasanya gejala klinis keduanya tidak berbeda, walaupun demam paratifoid cenderung tidak separah demam tifoid. Pada beberapa dekade terakhir demam tifoid sudah jarang terjadi di negara-negara industri, namun tetap menjadi masalah kesehatan yang serius di sebagian wilayah dunia, seperti bekas negara Uni Soviet, anak benua India Asia Tenggara, Amerika Selatan dan Afrika. Menurut WHO, diperkirakan terjadi 16 juta kasus pertahun dan 600 ribu diantaranya berakhir dengan kematian. Sekitar 70% dari seluruh kasus kematian itu menimpa penderita demam tifoid di Asia (Rasional, 2002). Insiden di Indonesia rata-rata 900.000 kasus/tahun dengan angka kematian > 20.000 dan 91% kasus terjadi pada umur 3-19 tahun (Tatat novianti, 2006).

Salmonella typhi adalah bakteri gram negatif, termasuk keluarga *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini memiliki antigen O9 dan O12 LPS, antigen protein flagelar Hd dan antigen kapsular Vi. Di Indonesia beberapa isolat

memiliki jenis flagella yang unik yaitu Hj (Parry CM, 2002). *Salmonella typhi* merupakan patogen enterik yang sangat virulen dan invasif yang menyerang manusia. Sumber penularan terutama melalui pencemaran makanan atau minuman oleh bakteri tersebut yang dikeluarkan melalui tinja penderita demam tifoid. Masa inkubasi demam tifoid berkisar antara 10-14 hari dan gejalanya muncul bertahap. Paling sering berupa gejala demam yang tidak spesifik, seperti sakit kepala, lesu, yeri otot atau nafsu makan menurun. Awalnya demam cenderung mereda, tetapi secara bertahap meningkat setelah minggu pertama sampai mencapai suhu lebih dari 40^oC. Gejala lain yang timbul meliputi mual, muntah, menggigil, batuk, lemah dan radang tenggorokan (Rasional. 2002).

Pada lima tahun terakhir ini, para klinisi di beberapa negara mengamati adanya kasus demam tifoid anak yang berat bahkan fatal, yang ternyata disebabkan oleh *strain Salmonella typhi* yang telah resisten terhadap antibiotik yang lazim dipergunakan untuk pengobatan demam tifoid (Bhutta ZA, Khan IA, Molla. 1994). *Strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap 2 atau lebih jenis antibiotik yang lazim dipergunakan yaitu ampisilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol dinamai *strain multi drug resistance (MDR) Salmonella typhi*. (Girgis NI, Sultan Y, Hammad O, Farid ZH. 1995). Dengan ditemukannya MDR *Salmonella typhi*, maka pemilihan antibiotik yang tepat akan menjadi masalah,

Sejak tahun 1948 kloramfenikol merupakan *drug of choice* untuk infeksi Salmonela. Keampuhan kloramfenikol pada pengobatan demam tifoid telah diakui berdasarkan efektifitasnya terhadap *Salmonella typhi* di samping harga obat relatif murah. Setelah kloramfenikol bertahan sekitar 25 tahun, dilaporkan oleh beberapa peneliti di berbagai negara adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol (Bhutta ZA. 1997). Peneliti India melaporkan adanya kasus demam tifoid yang resisten terhadap kloramfenikol pada tahun 1970, sedangkan di Mexico pertama kali dilaporkan pada tahun 1972. Resistensi tersebut ternyata diikuti oleh adanya resistensi *Salmonella typhi* terhadap obat-obat lain yang biasa dipergunakan untuk mengobati demam tifoid. Di negara berkembang, antibiotik yang tersedia untuk pengobatan demam tifoid adalah ampisilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol. Olarte dan Galindo melaporkan pertama kali adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap ampisilin dan kloramfenikol di Mexico tahun 1973 (Mirza SH. 1995). Pada saat itu kotrimoksazol baru ditemukan sebagai pengganti kloramfenikol untuk mengobati demam tifoid; tetapi, ternyata kotrimoksazol cepat menjadi resisten. Pada perkembangan resistensi *Salmonella typhi* selanjutnya, beberapa negara melaporkan adanya *strain Salmonella typhi* yang telah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik utama untuk pengobatan demam tifoid yaitu kloramfenikol, ampisilin, amoksisilin, dan kotrimoksazol (*multi-drug resistant* = *MDR Salmonella typhi*) (Memon IA, Billoo AG, Memon HI. 1998). Thailand (1984)

merupakan negara yang pertama kali melaporkan adanya MDR pada demam tifoid anak, selanjutnya diikuti oleh negara lain.

Multidrug resistance yang terjadi pada era 1970 – 1990 menyebabkan obat-obat tersebut digantikan dengan fluoroquinolone atau cephalosporin generasi ketiga (Rasional, 2002). Ciprofloksasin lebih efektif dari pada kloramfenikol dalam mengeliminasi *Salmonella enterica* serovars Typhi dan Paratyphi A dari sum-sum tulang (M. Hussein Gasem, dkk. 2003). Akhir-akhir ini, fluoroquinolone terbukti efektif untuk mengobati demam tifoid dan menjadi alternative pertama dalam pengobatan demam tifoid (Kenji Hirose, dkk. 2002).

Fluoroquinolon pada awal dikembangkan karena kehebatan aktivitasnya terhadap bakteri aerobik gram-negatif, sementara aktivitasnya terhadap organisme gram positif terbatas. *Ciprofloksasin, enofloksasin, lomefloksasin, levofloksasin, ofloksasin* merupakan agen-agen yang memiliki aktivitas gram negative yang baik dan aktivitas dari sedang hingga baik terhadap bakteri gram positif. (Katzung, 2004).

Ciprofloksasin adalah salah satu antibiotika golongan quinolon generasi kedua (II). Mekanisme kerjanya adalah menghambat aktivitas DNA gyrase bakteri, bersifat bakterisidal dengan spectrum luas terhadap baik gram positif maupun negative. Ciprofloksasin efektif digunakan untuk infeksi saluran kemih, uretritis, demam typhoid dan paratyphoid, infeksi saluran napas, infeksi jaringan lunak serta osteomielitis. (Brooks dkk, 2001)

Wallace (1993) melakukan uji klinis acak membandingkan seftriakson (3 g, parenteral, 1 kali sehari selama 7 hari) dengan ciprofloksasin (500 mg, diberikan oral dua kali sehari selama 7 hari) untuk terapi demam tifoid dengan kultur darah positif. Hasilnya, kegagalan klinis ditemukan pada 6 pasien (27%) kelompok seftriakson, sedangkan pada kelompok ciprofloksasin tidak ditemukan ($p=0,01$). Terapi untuk keenam pasien tersebut diganti dengan ciprofloksasin dan pasien menjadi afebris serta gejala menghilang dalam 48 jam. Kesimpulan dari studi ini adalah bahwa ciprofloksasin merupakan pilihan terapi yang bermanfaat pada daerah dimana strain multi resisten mungkin ditemukan. (Juniastuti, dkk. 2005)

Perubahan pada QRDRs (*Quinolone Resistance Determining Regions*) dalam DNA gyrase (*gyrA*, *gyrB*) atau DNA topoisomerase IV (*parC*, *parE*) merupakan mekanisme utama untuk resistensi fluoroquinolon pada bakteri Gram negative, seperti *E. coli* dan *P. aeruginosa* (Lee, Kim, Park, 2005; Lee, Lee, Park, 2005)

Beberapa tahun terakhir ini, hasil isolasi klinik *Salmonella typhi* telah menunjukkan penurunan kerentanan atau resistensi pada fluoroquinolon pada beberapa negara-negara berkembang termasuk Jepang. Mekanisme resistensi fluoroquinolon telah banyak diteliti, resisten yang sering memberikan kontribusi adalah adanya mutasi pada gen yang mengkode DNA gyrase (*gyr A*, *gyr B*) atau DNA topoisomerase IV (*par C*, *par E*). Perubahan codon Ser-83 dan Asp-87 dari *gyr A* adalah yang paling sering

ditemukan pada isolat klinik dengan penurunan efektifitas fluoroquinolon. (Kenji H, dkk. 2002; Gaiind R, dkk. 2006)

Resistensi fluoroquinolon termasuk ciprofloksasin, akibat mutasi pada *par E* telah ditemukan pada spesies bakteri *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Mycoplasma hominis* dan *Salmonella enterica*. Posisi daerah mutasi yang terjadi pada *par E* menyebabkan resistensi fluoroquinolon adalah 424 – 460 (Lindgren, dkk. 2003; Ling, dkk. 2003)

Kim dan Baik (2004) telah melaporkan adanya mutasi gen *par E* pada *P. aeruginosa* pada posisi 362Glutamat (GAA-GAG); 366Glutamat (CAA-CAG); 367Leucin (CTG-TTG); 374Asparagines (AAC-AAT); 448Glutamat (GAA-GAG); 472Glycine (GGT-GGC); 474Serine (AGT-AGC); 477Alanine (GCC-GCT); 484Isoleucine (ATC-ATT). Dengan menggunakan primer yang sama dilaporkan bahwa perubahan asam amino sub unit *par E* yaitu Asp(419) menjadi Asn dan Glu(459) menjadi Asp, merupakan pelengkap resistensi ciprofloksasin pada *P. aeruginosa* dan digolongkan sebagai resistensi fluoroquinolon. (Lee dkk, 2005; Ito dkk, 2006).

Sesilia R (2007) telah melaporkan adanya mutasi gen *par E* dari *P. aeruginosa* isolate Makassar terhadap ciprofloksasin dengan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

Berdasarkan uraian di atas maka akan dilakukan penelitian tentang resistensi *Salmonella typhi* isolate Makassar terhadap ciprofloksasin berdasarkan mutasi pada *Par E*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian in adalah :

1. Apakah metode *Polymerase Chain Reaction and Restriction fragment length polymorphism* (PCR - RFLP) dapat mendeteksi mutasi gen *par E* dari *Salmonella typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin ?
2. Apakah PCR-RFLP dapat mendeteksi *Salmonella typhi* yang resisten terhadap ciprofloksasin, sesuai hasil pengujian *disc diffusion* ?
3. Bagaimana hubungan antara mutasi *Salmonella typhi* dengan sensitifitas terhadap ciprofloksasin berdasarkan hasil pengujian PCR-RFLP pada gen *par E* ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menganalisa adanya mutasi pada gen *par E* dari *Salmonella typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin berdasarkan hasil pengujian metode PCR - RFLP.
2. Menentukan isolat *Salmonella typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin berdasarkan hasil pengujian metode *disc diffusion* dan teknik PCR.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk pengembangan ilmu pengetahuan terutama penentuan lokasi mutasi gen pada ciprofloksasin.
2. Sebagai bahan rujukan bagi peneliti selanjutnya yang berminat mengembangkan penelitian resistensi terhadap ciprofloksasin.
3. Sebagai sumber informasi bagi peneliti selanjutnya yang berminat dalam pengujian resistensi antibiotika lainnya.

E. Depenisi dan Istilah

1. **Antibiotika** adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi atau bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroba lain, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil.
2. **Resistensi antibiotika** adalah ketahanan mikroba terhadap antibiotika tertentu yang dapat berupa resistensi alamiah, resistensi akibat mutasi spontan (resistensi kromosomal) dan resistensi karena adanya faktor R pada sitoplasma (resistensi ekstrakromosomal)
3. ***Polymerase Chain Reaction (PCR)*** adalah suatu cara sederhana dan cepat untuk memperbanyak sekuen DNA spesifik yang diinginkan dengan ukuran tertentu melalui mekanisme perubahan suhu. Prinsip dasar dari metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup.
4. **Sensitifitas** adalah kemampuan suatu uji dalam mendeteksi substansi dalam jumlah yang amat kecil. Rendahnya angka sensitifitas akan menghasilkan hasil negatif palsu.
5. **Spesifisitas** adalah kemampuan suatu uji mendeteksi hanya satu senyawa tunggal secara benar. Rendahnya angka spesifisitas akan menghasilkan positif palsu.

6. **Par E** adalah suatu sub unit enzim pada topoisomerase IV yang dapat mengalami substitusi nukleotida asam amino jika terjadi mutasi gen dari *Salmonella typhi* sehingga menjadi resisten terhadap antibiotika, contohnya ciprofloksasin.
7. **Mutasi gen** adalah perubahan susunan asam amino yang menyebabkan perubahan fungsi dan sifat, sehingga menjadi tidak peka terhadap mekanisme kerja antibiotika.
8. **Restriction fragment length polymorphism (RFLP)** adalah metode untuk merestriksi untai DNA yang telah diamplifikasi dengan mesin PCR, menggunakan enzim restriksi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Salmonella typhi

Salmonella sering pathogen untuk manusia atau binatang. Mereka disebarkan dari binatang dan produk dari binatang ke manusia, dimana mereka menyebabkan enteritis, infeksi sistemik dan demam enterik.

1. Morfologi dan Identifikasi

Salmonellae bervariasi panjangnya. Sebagian besar yang telah diisolasi motil dengan *peritrichous flagella*. Salmonellae tumbuh cepat dalam media yang sederhana, tetapi mereka hampir tidak pernah memfermentasikan laktosa atau sukrosa. Mereka membentuk asam dan kadang gas dari glukosa dan mannososa. Mereka biasanya memproduksi H₂S. Mereka tahan hidup dalam air membeku pada periode yang lama. Salmonella tahan terhadap bahan kimia tertentu (misalnya *brilliant green*, *sodium tetrathionate*, *sodium deoxycholate*) yang menghambat bakteri enterik lain; senyawa tersebut kemudian berguna untuk ditambahkan pada media untuk mengisolasi salmonellae dari tinja. (Brooks dkk, 2001)



Gambar 1. Flagellar dari *Salmonella typhi* (Bacteriology at UW- Madison, 2005)

2. Klasifikasi

Klasifikasi salmonellae sangat kompleks karena organisme ini biasanya lebih merupakan sebuah kesatuan rangkaian dibanding sebagai spesies tersendiri. Anggota jenis salmonellae biasanya diklasifikasikan menurut dasar epidemiologi, jenis inang, reaksi biokimia, dan struktur antigen O, H, dan V. Nama (misalnya *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*) ditulis sebagai jenis dan spesies; bentuk tatanama ini menyeluruh tetapi penggunaannya tidak benar. Studi tentang DNA hibridisasi memperlihatkan bahwa ada 7 kelompok evolusioner. Hampir semua serotipe salmonella yang menginfeksi manusia adalah DNA hibridisasi kelompok I : jarang infeksi manusia dengan kelompok IIIa dan IIIb. Nama spesies tunggal disarankan, *Salmonella choleraesuis*, tetapi hal ini dapat membingungkan karena ada serotipe untuk choleraesuis. Sebagai akibatnya, nama spesies *Salmonella*

enterica disarankan, dan organisme dalam DNA hibridisasi kelompok I *S. enterica* subspesies *enterica*. Organisme di kelompok lain mempunyai nama subspesies. Nama spesies *S. enterica* sudah digunakan secara internasional, hanya menunggu penerimaan normal. Kelihatannya, tatanama yang diterima secara luas untuk klasifikasi adalah sebagai berikut : *S. enterica* subspesies *enterica* serotipe thipimurium, dimana disingkat menjadi *Salmonella thipimurium* dengan huruf miring dan nama serotipe dalam tipe romawi. Laboratorium yang terekomendasi nasional dan internasional mungkin menggunakan formula antigenik sebagai nama subspesies karena mereka memberi informasi lebih tentang isolasi. Sebuah contoh *S. enterica* subspesies *salame* serotipe 50:z,e,n,x, dengan nomor II roman melambangkan subspesies *salamae* dari DNA hibridisasi grup II. (Brooks dkk, 2001)

Ada lebih dari 2400 serotipe salmonellae termasuk lebih dari 1400 dalam DNA hibridisasi group I yang dapat menginfeksi manusia. Empat serotipe salmonellae yang menyebabkan demam enterik dapat diidentifikasi dalam laboratorium yang terrekomendasi dengan tes biokimia dan tes serologis. Serotipe ini harus secara rutin diidentifikasi untuk ketepatan klinisnya. Mereka sebagai berikut : *Salmonella paratyphi* A (serogroup A), *Salmonella paratyphi* B (serogroup B), *Salmonella choleraesuis*-serotipe C1), dan *Salmonella typhi* (serotipe D). Lebih dari 1400 salmonellae lain yang diisolasi dalam laboratorium klinis dikelompokkan menurut antigen O-nya

yaitu A, B, C₁, C₂, D, dan E. Pengisolasian tersebut kemudian di kirim ke laboratorium terrekomendasi untuk identifikasi seorogi. (Brooks dkk, 2001)

3. Patogenesis dan Tanda Klinis

Salmonella typhi, *Salmonella choleraesuis*, dan mungkin *Salmonella paratyphi A* dan *Salmonella paratyphi B* merupakan penyebab infeksi utama pada manusia, dan infeksi dari bakteri ini bersumber dari manusia. Organisme hampir selalu masuk melalui jalan oral, biasanya dengan mengkontaminasi makanan atau minuman. Diantara faktor tempat yang mempengaruhi ketahanan terhadap infeksi salmonella adalah keasaman lambung. Flora normal dalam usus, dan ketahanan usus lokal.

Demam Enterik (Demam typhoid) : Gejala ini disebabkan oleh salmonella typhi (demam typhi). Ketika salmonella mencapai usus kecil, kemudian masuk ke getah bening dan kemudian ke aliran darah. Mereka dibawa oleh aliran darah ke beberapa organ, termasuk usus, organisme tersebut meningkat di dalam jaringan getah bening intestinal dan dikeluarkan dalam tinja. Sesudah masa inkubasi 10-14 hari, demam, rasa tidak enak badan, sakit kepala, konstipasi, bradycardia, dan myalgia terjadi. Demam meningkat ke masa stabil, limpa dan ginjal menjadi membesar. Rose spots biasanya ada di atas kulit perut atau dada, kelihatan jelas dalam beberapa kasus. Jumlah sel darah putih normal atau rendah. Pada masa preantibiotik, komplikasi utama dari demam enterik adalah hemorrhage dan perforasi, dan angka kematian rata-rata 10-15%.

Pengobatan dengan antibiotik telah menurunkan angka kematian rata-rata hingga kurang dari 1%. Lesi yang paling utama adalah hiperplasia dan nekrosis dari jaringan getah bening (misalnya potongan Peyer's), hepatitis, nekrosis dari ginjal dan peradangan limpa, periosteum, paru-paru dan organ lain. (Brooks dkk, 2001)

4. Uji Laboratorium Diagnostik

A. Spesimen :

Kultur darah harus diambil secepatnya. Demam enterik dan keracunan darah, kultur darah sering positif dalam minggu pertama penyakit. Kultur sumsum tulang mungkin dapat digunakan. Kultur urine mungkin positif sesudah minggu kedua. Spesimen tinja harus diambil secepatnya. Dalam demam enterik, tinja menghasilkan hasil positif pada minggu kedua atau ketiga.

B. Metode Bakteriologis untuk Pengisolasian Salmonellae

1. Kultur Differensial Medium – EMB, Mac-Concey's, atau medium deoksikholat memungkinkan pendeteksian cepat dari fermenter nonlaktosa (tidak hanya salmonellae dan shigellae tetapi juga proteus, serratia, pseudomonas, dan lainnya). Organisme gram positif dalam beberapa hal dihambat. Medium bismut sulfidat memungkinkan pendeteksian cepat dari *S. typhi*, yang membentuk koloni hitam karena produksi H₂S.

2. Kultur Medium Selektif – Spesimen ditempatkan diatas agar salmonella-shigella (SS), Hektoen agar enterik, XLD, atau agar *deoxycholate citrat* yang lebih cocok untuk pertumbuhan salmonella dan shigellae daripada Enterobacteriaceae.
3. Kultur Pengayaan – Spesimen (biasanya tinja) juga diletakkan dalam *selenite F* atau *tetrathionate broth*, dimana keduanya menghambat replikasi bakteri saluran usus normal dan memungkinkan meningkatkan salmonellae. Sesudah inkubasi 1-2 hari, ini ditanam pada media differensial dan selektif.
4. Identifikasi Akhir – Koloni darimedia padat diidentifikasi oleh bentuk reaksi biokimia dan tes aglutinasi mikroskop dengan serum spesifik.



Gambar 2. Kultur *Salmonella typhi* (Bacteriology at UW- Madison, 2005)

C. Metode Serologi

Teknik serologi digunakan untuk mengidentifikasi kultur yang tidak dikenal dengan serum yang dikenal dan mungkin digunakan untuk mengenali antibodi titer pada pasien dengan penyakit yang tidak dikenal, meskipun kemudian tidak berguna dalam mendiagnosis infeksi salmonella.

1. **Tes Aglutinasi** – Pada tes ini, serum yang diketahui dan kultur yang tidak diketahui dicampur diatas sebuah slide. Akan terjadi gumpalan, dapat dilihat dalam beberapa menit. Tes ini khusus berguna untuk pengidentifikasian kultur awal secara cepat. Ada alat komersial yang mungkin untuk mengaglutinasi dan mengelompokkan serum salmonellae dengan antigen O: A, B, C₁, C₂, D dan E.
2. **Tes Aglutinasi Pengenceran Tabung (Widal Tes)** – Serum aglutinasi akan meningkat dengan cepat selama minggu kedua dan ketiga pada infeksi salmonella. Paling tidak dua contoh serum, dicapai dalam interval 7-10 hari, dibutuhkan untuk membuktikan adanya peningkatan titer antibodi. Proses pengenceran berurutan dari serum yang tidak diketahui dites terhadap antigen dari salmonellae yang representatif. Hasilnya diartikan sebagai berikut : 1) Tinggi atau menaiknya titer O (\geq 1:160) menyatakan bahwa infeksi aktif terjadi. 2) Titer H tinggi (\geq 1:160) menyatakan adanya imunisasi atau infeksi terdahulu. 3) Titer

antibodi yang tinggi terhadap antigen Vi terjadi pada beberapa carrier (pembawa) penyebab. Hasil tes serologis untuk infeksi salmonella harus diartikan secara hati-hati. Adanya kemungkinan reaksi silang antibodi membatasi penggunaan serologi dalam diagnosis infeksi salmonella. (Brooks dkk, 2001)

5. Kekebalan

Infeksi oleh *Salmonella typhi* atau *Salmonella paratyphi* memberi sebuah derajat kekebalan tertentu. Infeksi berulang mungkin terjadi namun lebih ringan dibanding infeksi pertama. Perputaran antibodi dari O dan Vi berhubungan dengan ketahanan terhadap infeksi dan penyakit. Meskipun demikian, kekambuhan mungkin terjadi dalam 2-3 minggu sesudah sembuh. Pengeluaran antibodi IgA mungkin mencegah penambahan salmonellae pada epithelium intestinal. (Brooks dkk, 2001)

6. Pengobatan

Sejak tahun 1948 kloramfenikol merupakan *drug of choice* untuk infeksi Salmonela. Keampuhan kloramfenikol pada pengobatan demam tifoid telah diakui berdasarkan efektifitasnya terhadap *Salmonella typhi* di samping harga obat relatif murah. Setelah kloramfenikol bertahan sekitar 25 tahun, dilaporkan oleh beberapa peneliti di berbagai negara adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol (Bhutta ZA. 1997).

Di negara berkembang, antibiotik yang tersedia untuk pengobatan demam tifoid adalah ampisilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol. Olarte dan Galindo

melaporkan pertama kali adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap ampisilin dan kloramfenikol di Mexico tahun 1973 (Mirza SH. 1995). Pada saat itu kotrimoksazol baru ditemukan sebagai pengganti kloramfenikol untuk mengobati demam tifoid; tetapi, ternyata kotrimoksazol cepat menjadi resisten. Pada perkembangan resistensi *Salmonella typhi* selanjutnya, beberapa negara melaporkan adanya *strain Salmonella typhi* yang telah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik utama untuk pengobatan demam tifoid yaitu kloramfenikol, ampisilin, amoksisilin, dan kotrimoksazol (*multi-drug resistant = MDR Salmonella typhi*) (Memon IA, Billoo AG, Memon HI. 1998).

Multidrug resistance yang terjadi pada era 1970 – 1990 menyebabkan obat-obat tersebut digantikan dengan fluoroquinolone atau cephalosporin generasi ketiga (Rasional, 2002).

Wallace (1993) melakukan uji klinis acak membandingkan seftriakson (3 g, parenteral, 1 kali sehari selama 7 hari) dengan ciprofloksasin (500 mg, diberikan oral dua kali sehari selama 7 hari) untuk terapi demam tifoid dengan kultur darah positif. Hasilnya, kegagalan klinis ditemukan pada 6 pasien (27%) kelompok seftriakson, sedangkan pada kelompok ciprofloksasin tidak ditemukan ($p=0,01$). Terapi untuk keenam pasien tersebut diganti dengan ciprofloksasin dan pasien menjadi afebris serta gejala menghilang dalam 48 jam. Kesimpulan dari studi ini adalah bahwa ciprofloksasin

merupakan pilihan terapi yang bermanfaat pada daerah dimana strain multi resisten mungkin ditemukan. (Juniastuti, dkk. 2005)

Girgis (1999) melakukan uji klinis acak pada 123 pasien dewasa dengan demam dan gejala-gejala demam tifoid tanpa komplikasi dengan tujuan membandingkan efikasi klinis dan bakteriologis dari azitromisin dan ciprofloksasin untuk demam tifoid. Resistensi multi obat terhadap ampisilin, kloramfenikol dan trimetoprim-sulfametoksazol ditemukan pada 21 isolat dari 64 pasien dengan kultur positif. Dari ke-64 pasien ini, 36 menerima azitromisin oral 1 g 1x sehari pada hari pertama, dilanjutkan 500 mg oral 1 x sehari selama 6 hari berikutnya. Sebanyak 28 pasien menerima ciprofloksasin 500 mg oral 2x sehari selama 7 hari. Hasilnya menyatakan bahwa azitromisin dan ciprofloksasin sama efektif, baik secara klinis maupun bakteriologis, untuk terapi demam tifoid yang disebabkan oleh organisme yang sensitif ataupun *S. typhi* resisten multi obat. (Laporan studi Antimicrobial Resistance in Indonesia)

7. Epidemiologi

Tinja orang yang berpenyakit klinis yang tidak dicurigai atau yang merupakan carrier merupakan sumber kontaminasi yang lebih penting daripada kasus klinis yang jelas diisolasikan, misalnya ketika carrier bekerja sebagai pembawa makanan merupakan penyebar. Banyak binatang, termasuk ternak, hewan pengerat, dan unggas, secara alami terinfeksi dengan berbagai salmonellae dan mempunyai bakteri dalam jaringannya,

ekskreta, atau telur. Masalahnya mungkin menjadi serius dengan menyebarnya penggunaan pakan ternak yang menggunakan obat antimikrobal yang menyebabkan proliferasi resistensi obat terhadap salmonella dan penyebarannya pada manusia.

A. Carriers : Setelah infeksi subklinis, beberapa individu melanjutkan untuk mempertahankan salmonellae dalam jaringan tubuh selama waktu yang bervariasi. Tiga persen typhoid yang bertahan menjadi carrier permanen, berada dalam *gallbladder*, saluran biliary atau intestinum dan saluran urine.

B. Sumber Infeksi : Sumber infeksi adalah makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh salmonellae. Sumber berikut penting :

1. Air – kontaminasi tinja sering mengakibatkan epidemik yang eksplosif.
2. Susu dan produk susu lain (es krim, keju, puding) – kontaminasi oleh tinja dan pasturisasi yang tidak cukup atau pembawa yang tidak benar.
3. Kerang – dari air yang terkontaminasi.
4. Telur (*dried or frozen eggs*) – dari unggas yang terinfeksi atau kontaminasi selama proses pendingin.
5. Daging atau produk daging – dari binatang yang terinfeksi atau kontaminasi dengan tinja hewan pengerat atau manusia,
6. Penyalahgunaan obat – marijuana dan obat lain.

7. Pewarna binatang – (misalnya carmine) digunakan dalam obat, makanan dan kosmetik.
8. Binatang peliharaan di rumah – kura-kura, anjing, kucing dan sebagainya.

8. Pencegahan dan Pengontrolan

Pengukuran sanitasi harus dikerjakan untuk mencegah kontaminasi makanan dan air dengan hewan pengerat atau binatang lain yang mengeluarkan salmonellae. Ternak yang terinfeksi, daging, dan telur harus dimasak dengan benar. Pembawa penyakit tidak boleh bekerja sebagai pembawa makanan dan harus diobservasi dengan persyaratan ke higienisan yang ketat.

B. Antimikroba

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Dalam hal ini mikroba berupa jasad renik dan tidak termasuk parasit. Sedangkan antibiotika adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain. (Setiabudy dan Gan, 1995).

1. Pembuatan Antibiotika

Pembuatan antibiotika secara mikrobiologi yaitu dengan membiakkan fungi dalam tangki-tangki besar bersama zat-zat gizi khusus. Oksigen atau

udara steril disalurkan ke cairan pembiakan guna mempercepat pertumbuhan fungi dan meningkatkan produksi antibiotikanya. Setelah diisolasi dari cairan kultur, antibiotika dimurnikan dan aktifitasnya ditentukan. Antibiotika semisintetis, yaitu apabila pada kultur substrat dibubuhi zat-zat tertentu, yang tercampurkan ke dalam antibiotika dasarnya. Antibiotika sintetis dibuat dengan sintesa kimiawi tanpa biosintesa (Tan dan Rahardja, 2002). Dewasa ini banyak antibiotika dibuat secara semisintetik atau sintetis penuh. Namun dalam praktek sehari-hari antimikroba sintetis yang tidak diturunkan dari produk mikroba (misalnya sulfonamide dan kuinolon) juga digolongkan sebagai antibiotika (Setiabudy. dan Gan, 1995).

2. Sifat Antimikroba

Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas selektif. Hal ini berarti toksis bagi parasit tetapi aman bagi inangnya.. Seringkali toksisitas selektif bersifat relatif dan tidak mutlak, yang berarti konsentrasi obat yang toleran terhadap inang dapat merusak mikroba penyebab infeksi. Toksisitas selektif mungkin merupakan fungsi reseptor spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat-obatan, atau biasa karena hambatan biokimia yang terjadi pada organisma tetapi tidak bagi inangnya. (Brooks, dkk, 2001).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif antimikroba dapat bersifat bakterostatik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan bersifat bakteriosida yang dapat membunuh mikroba. Antimikroba tertentu aktifitasnya dapat meningkat dari bakterostatik menjadi bakteriosida jika

konsentrasi pemberiannya ditingkatkan melebihi kadar hambat minimalnya. Kadar hambat minimal adalah kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba sedangkan kadar bunuh minimal adalah kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba (Setiabudy. dan Gan, 1995)

3. Mekanisme Kerja Antimikroba

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok:

a. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba.

Obat-obat golongan ini adalah sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Mekanisme kerjanya berdasarkan sifat kompetisi dan bersifat bakterostatik. Mikroba patogen yang membutuhkan asam folat harus mensintesa sendiri dari *para amino benzoic acid* (PABA). Apabila sulfonamid atau sulfon menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional sehingga kehidupan mikroba terganggu. (Setiabudy. dan Gan, 1995).

b. Antimikroba yang menghambat sintesa dinding sel mikroba

Obat-obat golongan ini adalah penisilin, sefalosforin, basitrasin, vancomisin, dan sikloserin (Setiabudy. dan Gan, 1995). Dinding sel bakteri terdiri atas jaringan makromolekuler peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Penisilin dan beberapa antibiotika

lainnya mencegah sintesis peptidoglikan yang utuh sehingga dinding sel akan melemah dan akibatnya sel bakteri akan mengalami lisis (Naim, 2003). Oleh karena tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel menyebabkan terjadinya lisis dan merupakan dasar efek bakteriosida. (Setiabudy. dan Gan, 1995).

c. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Obat-obat yang termasuk golongan ini adalah polimiksin, polien, triazol, imidasol, kolistin, amfoterisin B (Brooks dkk, 2001). Polimiksin merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba tetapi tidak aktif terhadap bakteri gram positif karena jumlah fosfornya rendah. Polien aktif terhadap sel fungi karena bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membrane sel fungi. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Setiabudy. dan Gan, 1995).

d. Antimikroba yang menghambat sintesa protein sel mikroba

Obat yang termasuk dalam golongan ini adalah aminoglikosida, makrolid (eritromisin, azitromisin, klaritromisin, diritromisin), linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol (Brooks, GF, dkk, 2001). Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesa berbagai protein yang berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Penghambatan sintesa protein terjadi dengan berbagai cara seperti; streptomisin berikatan dengtan ribosom 30S sehingga kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA waktu sintesa protein. Eritromisin

berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke peptide. Linkomisin pada 50S, tetrasiklin pada 30S dan kloramfenikol pada 50S. (Setiabudy. dan Gan, 1995).

e. Antimikroba yang menghambat sintesa asam nukleat sel mikroba

Obat yang termasuk golongan ini adalah quinolon, pirimetamin, rifampisin, sulfonamide, trimetoprim dan trimetrexat. Semua quinolon dan fluoroquinolon menghambat sintesa DNA mikroba dengan memblokir helix DNA (Brooks dkk, 2001). Beberapa obat bersifat antimikroba karena sifat sitotoksiknya sehingga sering digunakan sebagai obat kanker. Golongan quinolon menghambat enzim DNA girase pada bakteri yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral sehingga bisa termuat dalam sel bakteri yang kecil. (Setiabudy dan Gan, 1995).

4. Penggunaan Antimikroba di Klinik

Penggunaan terapeutik antimikroba di klinik bertujuan membasmi mikroba penyebab infeksi. Penggunaan antimikroba ditentukan berdasarkan indikasi dengan mempertimbangkan faktor-faktor berikut:

- a. Gambaran klinik penyakit infeksi, yakni efek yang ditimbulkan oleh adanya mikroba dalam tubuh hospes, dan bukan berdasarkan kehadiran mikroba tersebut semata-mata.

- b. Efek terapi antimikroba pada penyakit infeksi diperoleh hanya sebagai akibat kerja antimikroba terhadap biomekanisme mikroba dan tidak terhadap biomekanisme tubuh hospes.
- c. Antimikroba bukan merupakan obat penyembuh penyakit infeksi sebenarnya tetapi hanya mempersingkat waktu yang dibutuhkan untuk penyembuhan infeksi

Dengan adanya infeksi mikroba maka tubuh hospes akan bereaksi mengaktifkan mekanisme daya tahan tubuhnya. Sebagian besar infeksi yang terjadi pada hospes dapat sembuh dengan sendiri tanpa memerlukan antimikroba.

Gejala klinik infeksi dapat terjadi akibat gangguan langsung oleh mikroba maupun oleh berbagai zat toksik yang dihasilkan oleh mikroba. Bila mekanisme pertahanan tubuh berhasil, mikroba dan zat toksik yang dihasilkannya dapat disingkirkan. Dalam hal ini tidak diperlukan pemberian antimikroba untuk penyembuhan penyakit infeksi.

Keputusan perlu tidaknya pemberian antimikroba pada suatu infeksi, perlu diperhatikan gejala klinik, jenis dan pagositas mikrobanya, serta kesanggupan mekanisme daya tahan tubuh hospes.

Penyakit infeksi dengan gejala klinik ringan, tidak perlu segera mendapatkan antimikroba. Menunda pemberian antimikroba malahan memberikan kesempatan terangsangnya mekanisme kekebalan tubuh. Tetapi penyakit infeksi dengan gejala yang berat, walaupun belum

membahayakan, apalagi bila telah berlangsung lama, dengan sendirinya memerlukan terapi antimikroba.

Gejala demam yang merupakan salah satu gejala sistemik penyakit infeksi yang paling umum, bukan merupakan indikator yang kuat untuk pemberian antimikroba. Pemberian antimikroba berdasarkan adanya demam tidak bijaksana, karena: (1). Pemberian antimikroba yang tidak pada tempatnya dapat merugikan pasien berupa efek samping. (2). Demam dapat disebabkan oleh penyakit infeksi virus, yang cukup tinggi angka kejadiannya dan tidak dapat dipercepat penyembuhannya dengan pemberian antimikroba yang lazim. (3). Demam dapat juga terjadi pada penyakit non infeksi, yang dengan sendirinya bukan indikasi untuk pemberian antimikroba.

Antimikroba hanyalah mempercepat penyembuhan penyakit infeksi, maka antimikroba hanya diperlukan bila infeksi berlangsung lebih dari beberapa hari dan dapat menimbulkan akibat cukup berat, misalnya pada tifus abdominalis, faringitis oleh *Streptococcus pyogenes* dengan kemungkinan komplikasi penyakit jantung di kemudian hari.

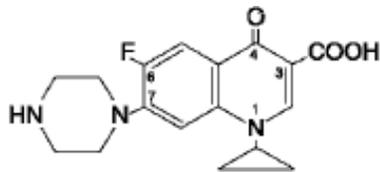
Indikasi untuk pemberian antimikroba pada seorang pasien haruslah dipertimbangkan dengan seksama, dan sangat bergantung pada pengalaman pengamatan klinik dokter yang mengobati pasien (Setiabudy. dan Gan, 1995).

C. Ciprofloksasin

Antibiotik fluorokuinolon (kuinolon) pertama kali diperkenalkan pada tahun 1960. Kuinolon yang pertama, yaitu asam nalidixat memiliki keterbatasan oleh karena aktivitas intrinsik yang rendah dan cepatnya terjadi resistensi. Penambahan fluor pada molekul kuinolon menghasilkan fluorokuinolon - pertama kali diperkenalkan sebagai siprofloksasin pada 1987 – yang memiliki spektrum lebih luas terhadap bakteri gram negatif, namun aktivitas terhadap gram positif lemah, terutama terhadap *Streptococcus pneumoniae*. (Hooper DC, 2001)

1. Deskripsi

Ciprofloksasin hidroklorida dibuat dalam bentuk tablet dan suspensi, merupakan antimikroba sintetik berspektrum luas. Nama kimianya adalah garam monohidroklorida monohidrat dari 1-siklopropil-6-fluoro-1, 2-dihidro-4-oksi-7-(1-piperazinil)-3-asam kuinolinkarboksilat., dengan berat molekul 385,8 . Formula empirisnya adalah $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \bullet HCl \bullet H_2O$. Struktur kimia ciprofloksasin adalah sebagai berikut : (Setiabudy R, 1995)



Gambar 3. Struktur Kimia Ciprofloksasin

2. Farmakokinetik

A. Absorpsi

Ciprofloksasin oral diserap dengan baik melalui saluran cerna. Bioavailabilitas absolut adalah sekitar 70%, tanpa kehilangan yang bermakna dari metabolisme fase pertama. Konsentrasi serum maksimal dicapai 1 sampai 2 jam setelah dosis oral. Konsentrasi rata-rata 12 jam setelah dosis 250, 500 dan 750 mg adalah 0,1; 0,2 dan 0,4 mg/mL. (Setiabudy R, 1995)

B. Distribusi

Ikatan ciprofloksasin terhadap protein serum adalah 20-40% sehingga tidak cukup untuk menyebabkan interaksi ikatan protein yang bermakna dengan obat lain.

Setelah administrasi oral, ciprofloksasin didistribusikan ke seluruh tubuh. Konsentrasi jaringan seringkali melebihi konsentrasi serum, terutama di jaringan genital, termasuk prostat. Ciprofloksasin ditemukan dalam bentuk aktif di saliva, sekret nasal dan bronkus, mukosa sinus, sputum cairan gelembung kulit, limfe, cairan peritoneal, empedu dan jaringan prostat. (Setiabudy R, 1995). Ciprofloksasin juga dideteksi di paru-paru, kulit, jaringan lemak, otot, kartilago dan tulang. Obat ini berdifusi ke cairan serebro spinal, namun konsentrasi di CSS adalah kurang dari 10% konsentrasi serum puncak. Ciprofloxacin juga ditemukan pada konsentrasi rendah di aqueous humor dan vitreus humor.

C. Metabolisme

Empat metabolit ciprofloksasin yang memiliki aktivitas antimikrobal yang lebih rendah dari ciprofloksasin bentuk asli telah diidentifikasi di urin manusia sebesar 15% dari dosis oral. (Setiabudy R, 1995)

D. Ekskresi

Waktu paruh eliminasi serum pada subjek dengan fungsi ginjal normal adalah sekitar 4 jam. Sebesar 40-50% dari dosis yang diminum akan diekskresikan melalui urin dalam bentuk awal sebagai obat yang belum diubah. Ekskresi ciprofloksasin melalui urin akan lengkap setelah 24 jam . Dalam urin semua fluorokuinolon mencapai kadar yang melampaui konsentrasi hambat minimal (KHM) untuk kebanyakan kuman patogen selama minimal 12 jam. Klirens ginjal dari ciprofloksasin, yaitu sekitar 300 mL/menit, melebihi laju filtrasi glomerulus yang sebesar 120 mL/menit. Oleh karena itu, sekresi tubular aktif memainkan peran penting dalam eliminasi obat ini. Pemberian ciprofloksasin bersama probenesid berakibat pada penurunan 50% klirens renal siprofloksasin dan peningkatan 50% pada konsentrasi sistemik. (Setiabudy R, 1995)

3. Interaksi Obat

Ciprofloksasin sediaan tablet bila diberikan bersama makanan, akan mengalami terjadi keterlambatan absorpsi, sehingga konsentrasi puncak baru akan dicapai 2 jam setelah pemberian. Pada ciprofloksasin sediaan suspensi,

tidak terjadi keterlambatan absorpsi bila diberikan bersama makanan sehingga konsentrasi puncak dicapai dalam 1 jam. Bila diberikan bersama dengan antasid yang mengandung magnesium hidroksida atau aluminium hidroksida dapat mengurangi bioavailabilitas ciprofloksasin secara bermakna. (The Human Health, FDA)

4. Spektrum Antibakteri Ciprofloksasin

Ciprofloksasin bersifat bakterisid, terutama aktif terhadap bakteri gram negatif dan memiliki aktivitas lemah terhadap gram positif.

Berikut ini adalah spektrum antibakteri ciprofloksasin :

Mikroorganisme gram positif aerobik

Enterococcus faecalis (banyak strain hanya memiliki sensitivitas sedang)

Staphylococcus aureus (hanya strain yang sensitif terhadap metisilin)

Staphylococcus epidermidis (hanya strain yang sensitif terhadap metisilin)

Staphylococcus saprophyticus

Streptococcus pneumoniae (hanya strain yang sensitif terhadap penisilin)

Streptococcus pyogenes

Mikroorganisme gram negatif aerobik

Campylobacter jejuni

Proteus mirabilis

Citrobacter diversus

Proteus vulgaris

Citrobacter freundii

Providencia rettgeri

Enterobacter cloacae

Providencia stuartii

<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Shigella sonnei</i>

5. Mekanisme Kerja

Bentuk untai ganda DNA harus terpisah menjadi dua utas tunggal saat akan berlangsung replikasi dan transkripsi. Pemisahan ini selalu mengakibatkan terjadinya puntiran berlebihan pada untai ganda DNA sebelum titik pisah. Hambatan mekanik ini dapat diatasi oleh mikroba dengan bantuan enzim *gyrase* (topoisomerase II) yang kerjanya menimbulkan *negative supercolling*. Golongan fluoroquinolon menghambat kerja enzim DNA girase pada mikroba dan bersifat bakteriosidal. (Setiabudy. dan Gan, 1995).

6. Mekanisme Resistensi Ciprofloksasin (Hooper DC, 2001)

Ciprofloksasin merupakan generasi pertama golongan fluorokuinolon. Berikut ini akan dibahas mekanisme resistensi fluorokuinolon secara umum.

Fluorokuinolon (dan kuinolon pertama) merupakan antimikroba yang unik karena secara langsung menghambat sintesis DNA. Inhibisi ini tampaknya terjadi oleh interaksi antara obat dengan kompleks yang terdiri

dari DNA dan salah satu dari kedua enzim target: *DNA gyrase* dan topoisomerase IV.

Pada semua spesies, mekanisme resistensi fluorokuinolon mencakup satu atau dua dari tiga kategori utama, yaitu: perubahan dalam target obat dan perubahan dalam penetrasi obat untuk mencapai target. Enzim yang dapat mendegradasi atau memodifikasi kuinolon tidak ditemukan.

A. Perubahan pada enzim target

Kebanyakan studi mempelajari perubahan pada enzim target, yang secara umum terletak pada domain spesifik dari setiap tipe subunit. Perubahan ini terjadi akibat mutasi spontan dari gen yang mengkode subunit enzim sehingga dapat terjadi dalam jumlah kecil (1 dalam 10^6 sampai 1 dalam 10^9 sel) di populasi bakteri yang besar. Dengan subunit GyrA dan ParC dari bakteri resisten, perubahan asam amino secara umum terlokalisasi pada regio amino terminal yang mengandung tempat aktif, yaitu tirosin yang terkait pada rantai DNA yang putus sewaktu enzim bekerja. Perubahan asam amino yang mengakibatkan resistensi terkelompok dalam tiga dimensi, didasarkan pada struktur fragmen GyrA yang telah dipecah.

Perbedaan pada Target dan Resistensi Fluorokuinolon. Interaksi fluorokuinolon dengan kompleks baik *DNA gyrase* atau topoisomerase IV dengan DNA dapat menghambat sintesis DNA dan berakibat pada kematian sel. Potensi antibakteri dari kuinolon didefinisikan sebagai potensi dalam berikatan dengan dua target enzim. Banyak fluorokuinolon memiliki potensi

berbeda dalam mengikat *DNA gyrase* dan topoisomerase IV. Langkah pertama resistensi mutasi pada target obat biasanya terjadi melalui perubahan asam amino pada enzim target primer, dengan peningkatan KHM pada sel yang ditentukan oleh efek mutasi atau oleh derajat sensitivitas intrinsik dari target obat sekunder. Derajat resistensi yang lebih tinggi dapat terjadi melalui langkah mutasi kedua, dimana perubahan asam amino terjadi pada enzim target sekunder. Mutasi lebih lanjut mengakibatkan tambahan perubahan asam amino di salah satu enzim. Pola mutasi ini pada enzim target yang berubah-ubah mengimplikasikan bahwa baik potensi intrinsik yang tinggi terhadap target primer maupun kesamaan potensi melawan kedua target akan mempengaruhi kemungkinan pemilihan mutan resisten pertama.

B. Perubahan pada Penetrasi Obat

Untuk mencapai target pada sitoplasma sel, fluorokuinolon harus melewati membran sitoplasma dan juga membran luar pada bakteri gram negatif. Molekul fluorokuinolon cukup kecil dan memiliki karakteristik yang memungkinkan untuk melewati membran luar melalui protein porin. Resistensi fluoroquinolon pada bakteri gram negatif dikaitkan dengan reduksi porin dan penurunan akumulasi obat pada bakteri, tetapi pengukuran angka difusi menyatakan bahwa reduksi porin sendiri secara umum tidak cukup untuk mengakibatkan resistensi.

Penemuan yang lebih baru menyatakan bahwa resistensi yang disebabkan oleh pengurangan akumulasi membutuhkan adanya suatu sistem efluks endogen yang secara aktif memompa obat dari sitoplasma. Pada bakteri gram negatif, sistem ini secara khas memiliki tiga komponen: pompa efluks yang berlokasi di membran sitoplasma, protein membran luar dan protein fusi membran yang menyatukan keduanya. Obat ini secara aktif dikeluarkan dari sitoplasma atau membran sitoplasma melewati periplasma dan membran luar ke lingkungan luar sel. Energi untuk proses ini didapat dari gradien proton yang melalui membran. Sistem efluks ini secara khas mampu menyebabkan resistensi terhadap gabungan dari berbagai jenis struktur sehingga dikenal dengan istilah pompa *multi drug resistance (MDR pumps)*. Pompa ini ditemukan pada banyak bakteri. Di antara bakteri patogen, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pneumoniae* merupakan yang paling banyak dipelajari dalam hal sistem efluks yang menyebabkan resistensi fluorokuinolon. Pada beberapa kasus, ekspresi komponen dari sistem efluks ini telah terkendali. Resistensi disebabkan oleh mutasi kromosom yang mengakibatkan peningkatan ekspresi komponen pompa.

Gambaran struktural dari fluorokuinolon yang menentukan apakah ia akan dipengaruhi oleh sistem efluks masih belum dapat dijelaskan, tetapi berkorelasi dengan hidrofilitas pada pompa NorA dari *S. aureus*. Risiko terjadinya resistensi lebih kecil pada kuinolon yang merupakan substrat

lemah bagi pompa efluks, karena ekspresi berlebih dari pompa semacam itu tampaknya tidak efektif sebagai mekanisme resistensi.

Mekanisme Resistensi Lainnya

Mekanisme dominan resistensi fluorokuinolon yang telah diidentifikasi adalah : 1) mutasi kromosom yang menyebabkan penurunan afinitas terhadap *DNA gyrase* dan topoisomerasi IV dan 2) ekspresi berlebih pompa *MDR* endogen. Pernah dilaporkan resistensi fluorokuinolon yang diperantarai plasmid pada isolat klinis *Klebsiella pneumoniae*, yang dapat ditransfer pada *E. coli* di laboratorium. Baik mekanisme resistensi yang dapat ditransfer ini, maupun prevalensi dari resistensi fluorokuinolon yang diperantarai plasmid tidak diketahui.

7. Efek Samping

Fluoroquinolon jarang menimbulkan gangguan keseimbangan flora usus. Efek samping pada susunan saraf pusat yang bersifat ringan berupa sakit kepala, vertigo dan insomnia dan yang bersifat berat seperti reaksi psikotik, halusinasi, depresi dan kejang, jarang terjadi. Penderita usia lanjut dengan *arteriosclerosis* atau epilepsi cenderung mengalami efek samping berat ini.

Penderita yang mendapat terapi fluoroquinolon sebaiknya menghindari pajanan matahari berkepanjangan karena dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas berupa eritema atau pruritus (Setiabudy. dan Gan, 1995).

D. Resistensi Terhadap Antibiotika

Resistensi sel mikroba adalah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba oleh antimikroba. Sifat ini merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup.

1. Pola Resistensi Antibiotika

Berdasarkan sensitifitas mikroba dikenal tiga pola resistensi. Pola I : belum pernah terjadi resistensi bermakna yang menimbulkan kesulitan di klinik. Contoh *Streptococcus pyogenes* grup A terhadap penisilin G. Pola II : pergeseran dari sifat peka menjadi kurang peka, tetapi tidak terjadi resistensi sepenuhnya. Contoh gonococcus bukan penghasil penisilinase sehingga sebagian galur masih peka terhadap penisilin, tetapi jumlah galur yang memerlukan penisilin dosis tinggi terus bertambah. Pola III : sifat resistensi pada taraf yang cukup tinggi, sehingga menimbulkan masalah di klinik. Contoh galur tertentu dari *Staphylococcus* yang menghasilkan B-laktamase dapat berubah menjadi resisten terhadap penisilin G. (Setiabudy dan Gan, 1995).

2. Mekanisme Resistensi

Mekanisme resistensi mikroba terhadap obat ada lima. (Brooks dkk, 2001).

- a. **Mikroba menghasilkan enzim dan merusak obat yang aktif.** Misalnya penisilin G dirusak oleh enzim B-laktamase, aminoglikosida dirusak oleh

enzim adenilase, fosforilasi atau asetilase, kloramfenikol dirusak oleh enzim asetilase kloramfenikol. Enzim-enzim tersebut dihasilkan oleh bakteri.

- b. **Mikroba merubah permeabilitasnya terhadap obat.** Misalnya tetrasiklin terkumpul dalam bakteri yang peka tapi tidak dalam bakteri resisten, rendahnya permeabilitas mikroba terhadap obat, bakteri Streptokokus mempunyai barrier permeabilitas alami terhadap aminoglikosida.
- c. **Mikroba mengubah struktur target untuk obat.** Misalnya resistensi kromosom terhadap aminoglikosida akibat perubahan protein spesifik dalam sub unit 30S dari ribosom bakteri. Resistensi terhadap eritromisin akibat perubahan reseptor pada sub unit 50S ribosom. Resistensi terhadap penisilin dan sefalosforin akibat berubahnya PBP.
- d. **Mikroba mengembangkan jalur metabolisme baru yang menghindari jalur yang biasa dihambat oleh obat.** Misalnya, beberapa bakteri yang resisten terhadap sulfonamida tidak membutuhkan PABA ekstraseluler tapi seperti sel mamalia, dapat menggunakan asam folat.
- e. **Mikroba mengembangkan enzim baru yang masih dapat melakukan fungsi metaboliknya tapi sedikit dipengaruhi oleh obat.** Misalnya pada bakteri yang resisten terhadap trimetoprim, enzim dihidrofolat reduktase sedikit dihambat secara efisien daripada bakteri yang peka.

3. Resistensi Mikroba Terhadap Antibiotika (Setiabudy dan Gan, 1995 ; Brooks dkk, 2001).

a. Resistensi obat non genetik

Bakteri dalam keadaan istirahat (inaktifitas metabolik) biasanya tidak dipengaruhi oleh antimikroba. Keadaan ini dikenal sebagai resistensi non genetik. Mikroba tersebut dikenal sebagai persisters. Bila berubah menjadi aktif kembali, mikroba kembali bersifat sensitif dan keturunannya juga tetap bersifat sensitif terhadap antimikroba seperti semula.

b. Resistensi obat secara genetik

Resistensi kromosomal

Resistensi kromosomal atau mutasi spontan, terjadi perubahan gen mikroba sehingga mikroba yang sensitif terhadap suatu antimikroba menjadi resisten. Terjadi secara spontan karena terjadi tanpa pengaruh ada atau tidaknya antimikroba tersebut. Dalam hal ini terjadi seleksi, galur yang telah resisten bermultiplikasi sedangkan galur yang masih sensitif terbasmi, sehingga berakhir dengan terbentuknya populasi resisten.

Resistensi ekstra kromosomal

Resistensi ekstra kromosomal atau resistensi dipindahkan terjadi karena mikroba mendapat elemen pembawa faktor resisten. Faktor ini dapat dipindahkan dengan cara transformasi, transduksi atau konyugasi. Pada proses **konyugasi**, sel donor ikut memberi dan blok pembangun untuk sintesis untai baru DNA, yang secara fisik dipindahkan ke sel

penerima. Penerima melengkapi struktur DNA untai ganda dengan mensintesis untai pasangannya sebagai pelengkap bagi untai yang diperoleh dari donor. Dalam **transduksi**, DNA donor dibawa dalam suatu lapisan faga dan dipindahkan ke penerima lewat mekanisme yang digunakan untuk infeksi faga. **Transformasi**, pengambilan langsung DNA donor oleh sel penerima, dapat berlangsung secara alami atau dipaksakan. Secara alami strain bakteri mengasimilasi DNA donor dalam bentuk linear sedangkan yang dipaksakan, diinduksi dalam laboratorium seperti pemberian garam konsentrasi tinggi, syok suhu. Banyak bakteri menjadi mampu mengasimilasi plasmid ekstra sel. Kemampuan ini merupakan dasar dari rekayasa genetika.

c. Resistensi silang

Resistensi silang adalah keadaan resistensi terhadap antimikroba tertentu yang juga memperlihatkan sifat resistensi terhadap antimikroba yang lain. Pada resistensi silang, sifat resistensi ditentukan oleh satu lokus genetik yang berada dalam elemen ekstrakromosom (plasmid faktor R). resistensi silang biasanya terjadi antara antimikroba dengan struktur kimia yang hampir sama atau mekanisme kerja yang sama.

E. Pengendalian Resistensi Obat

Munculnya resistensi obat pada infeksi dapat dikurangi dengan cara berikut ; (1). Mempertahankan kadar yang cukup dalam jaringan untuk menghambat populasi asli dan mutasi tingkat rendah; (2). Memberi dua obat yang tidak memberi resistensi silang secara simultan, masing-masing menunda timbulnya mutan resisten terhadap obat yang lain, dan (3). Mencegah penampakan mikroorganisme terhadap obat dengan membatasi penggunaannya, khususnya di rumah sakit (Brooks dkk, 2001).

F. Implikasi Klinis Resistensi Obat

Kebanyakan resistensi terhadap obat pada bakteri enterik berdampak penyebaran resistensi lewat plasmid di antara berbagai genera yang ada. plasmid membawa gen resisten terjadi pada beberapa bakteri gram negatif flora normal usus. Penggunaan obat antimikrobia yang berlebihan khususnya pada pasien di rumah sakit menimbulkan penekanan terhadap organisme yang peka dalam flora usus dan membiarkan pertumbuhan dan penyebaran bakteri resisten, diantaranya *Pseudomonas*. (Brooks dkk, 2001)

G. Pengujian Resistensi Antibiotika

Aktifitas antimikroba secara *in vitro* dilakukan untuk menentukan (1). Potensi antimikroba dalam larutan (2). Konsentrasi antimikroba dalam cairan tubuh atau jaringan dan (3) kepekaan mikroorganisme terhadap obat tertentu.

Penentuan kepekaan bakteri terhadap antimikroba tertentu dapat dilakukan dengan metode dilusi atau difusi. Metode ini merujuk pada *National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)*.

Metode Dilusi

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair maupun padat. Kemudian media diinokulasikan bakteri uji dan diinkubasi. Tahap akhir dilarutkan antimikroba dengan kadar yang mematikan atau menghambat. Uji kepekaan cara dilusi agar, memakan waktu dan penggunaannya tertentu saja.

Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi sekarang dapat dipermudah dengan menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri.

Metode Difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada

permukaannya. Setelah dinkubasi, diameter zona hambatan sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji.

Interpretasi terhadap hasil uji difusi baru didasarkan pada perbandingan terhadap metode dilusi. Beberapa data perbandingan bisa digunakan sebagai standar referensi. Grafik regresi linier dapat menunjukkan hubungan log KHM pada cara dilusi dan diameter zona hambatan pada cara difusi cakram.

Penggunaan cakram tunggal pada setiap antibiotik dengan standarisasi yang baik, dapat menentukan apakah bakteri peka atau resisten dengan cara membandingkan zona hambatan standar bagi obat yang sama.

Daerah hambatan sekitar cakram yang berisi sejumlah tertentu antimikroba tidak mencerminkan kepekaan pada obat dengan konsentrasi yang sama per milliliter media, darah atau urin.

H. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah proses enzimatik untuk memperbanyak segmen DNA spesifik dengan cepat secara in vitro. Sebagaimana kloning molekuler, PCR telah memperbanyak telur, eksperimen yang tidak mungkin dilakukan sebelumnya. Aplikasi PCR memperlihatkan angka yang luar biasa. Teknik mesin PCR telah melakukan kloning secara langsung termasuk dari DNA

genom atau cDNA, mutagenesis secara in vitro, genom sidik jari dari sampel forensik, pengujian adanya bahan infeksi, kelainan genetik dalam diagnosa kehamilan, analisa variasi rangkaian alel, mencatat struktur RNA, genom bekas jejak kaki dan rangkaian nukleotida utamanya dari DNA dan cDNA. (Ansubel dkk, 1995).

1. Teknologi PCR

Dasar teori PCR berdasarkan tiga bagian asam nukleat. Satu bagian untai ganda DNA dan dua untai tunggal oligonukleotida yang bersisian dengan primer. Tiga komponen penyusun protein DNA polymerase yaitu deoksiribonukleosid trifosfat (dNTPs), suatu buffer dan garam-garam.

Primer-primer yang ditambahkan mempunyai banyak kelebihan dalam membandingkan DNA yang di amplifikasi. Primer menghibridisasi untai-untai DNA yang berlawanan dan dipasangkan pada ujung 3' dari tiap ujung lain. Kemudian disintesa oleh DNA polymerase (yang mengkatalisis perpanjangan untai dari 5' ke 3') sehingga memperpanjang segmen DNA yang terletak diantaranya.

Satu tahapan sintesa menghasilkan untai baru yang sama dengan untai induknya dengan panjang yang tidak terbatas. Hibridisasi oleh primer terjadi pada proses denaturasi dan annealing. Dalam hal ini jumlah hasil sintesa berdasarkan deret aritmatika dengan tiap siklus sintesa berikutnya. Demikianpun siklus kedua dari denaturasi, annealing dan sistesa menghasilkan dua untai tunggal yang bersama-sama menyusun produk

untaian ganda diantara sepanjang ujung-ujung primer. Tiap untaian merupakan produk yang berlainan sehingga akan saling dilengkapi oleh satu dari dua primer dan seterusnya akan mengambil bagian pada siklus berikutnya. Jumlah produk penggandaan dari tiap siklus sintesa, denaturasi dan annealing akan bertambah secara eksponensial contoh ; 30 siklus akan menghasilkan 2^{30} hasil kelipatan (270 juta hasil kelipatan).

PCR memungkinkan sekuensing kembali asam-asam nukleat tanpa melakukan kloning, sehingga dapat menghindari sulitnya proses kloning dari organ-organ. PCR telah banyak digunakan karena hasil pengujiannya sangat sensitif untuk sekuen tertentu. Suatu protokol kerja tidak hanya mendeteksi DNA tertentu tetapi juga jumlahnya. Kelemahan sensitifitas alat ini adalah kontaminasi sekecil apapun akan menyebabkan tidak ditemukannya sekuen yang diinginkan. Maka prosedur dirancang untuk menghindari kontaminasi dengan memurnikan sekuen DNA yang diinginkan.

Aplikasi lain dari PCR dapat digunakan untuk mendeteksi fragmen-fragmen, menganalisa struktur fragmen dan memperbanyak sekuen tersebut dengan melalui tahapan kloning atau tidak. Metode PCR oleh sebagian orang digunakan untuk mengetahui sesuatu sekuen yang kecil dengan cara memperbanyak hingga 30 – 40 kali siklus, contohnya; *anchored* PCR untuk menganalisa RNA atau metode lain seperti *ligation-mediated* PCR yang digunakan untuk menelusuri genom dari jejak kaki. (Ansubel dkk, 1995)

2. Prinsip Teknik PCR

Tujuan utama PCR adalah untuk mengkopi gen menjadi jumlah yang sangat besar. Tiga tahap utama dalam PCR yang dilakukan secara berulang 30 sampai 40 siklus. Hal ini dilakukan oleh mesin secara otomatis siklus pemanasan dan pendinginan tube sampel, dimana reaksi pencampuran terjadi dalam waktu yang sangat singkat.

Tahap-tahap dalam PCR adalah :

a. Denaturasi pada suhu 94⁰C

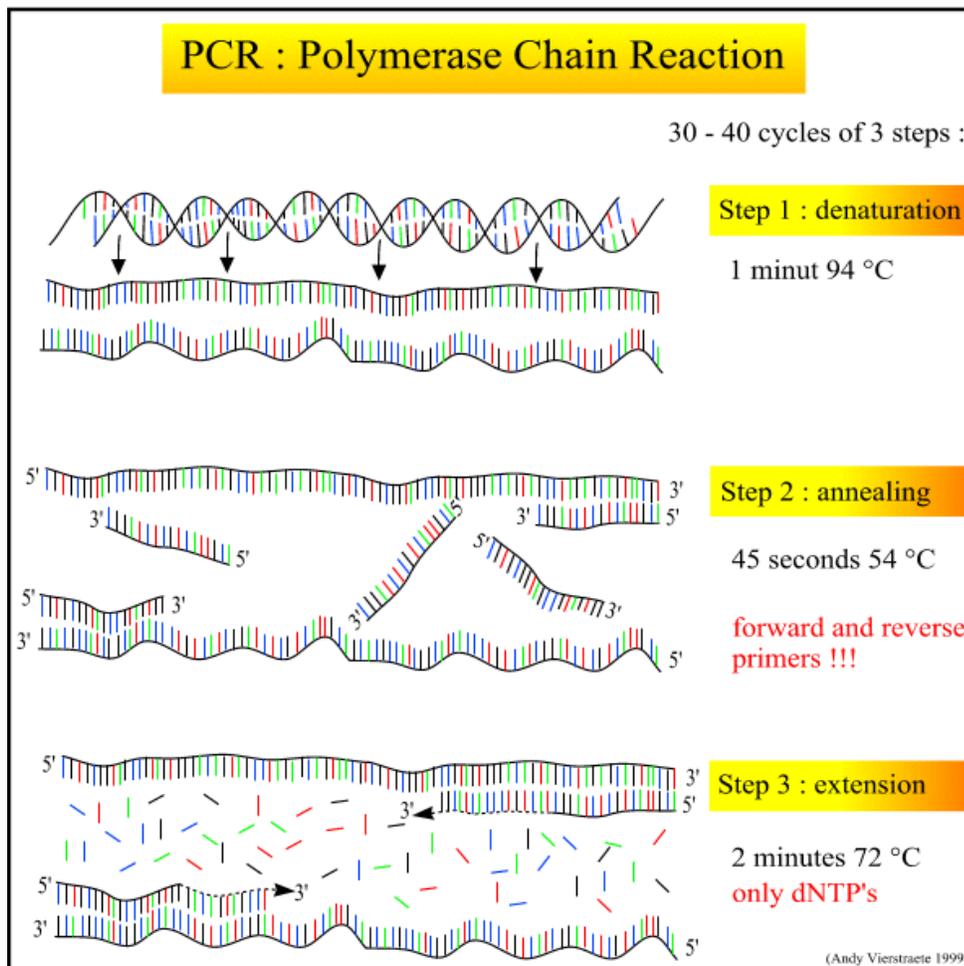
Selama denaturasi, untai DNA doublet terbelah menjadi untai tunggal DNA dan semua reaksi enzimatik berhenti (contoh reaksi ekstensi pada siklus sebelumnya)

b. Annealing pada suhu 54⁰C

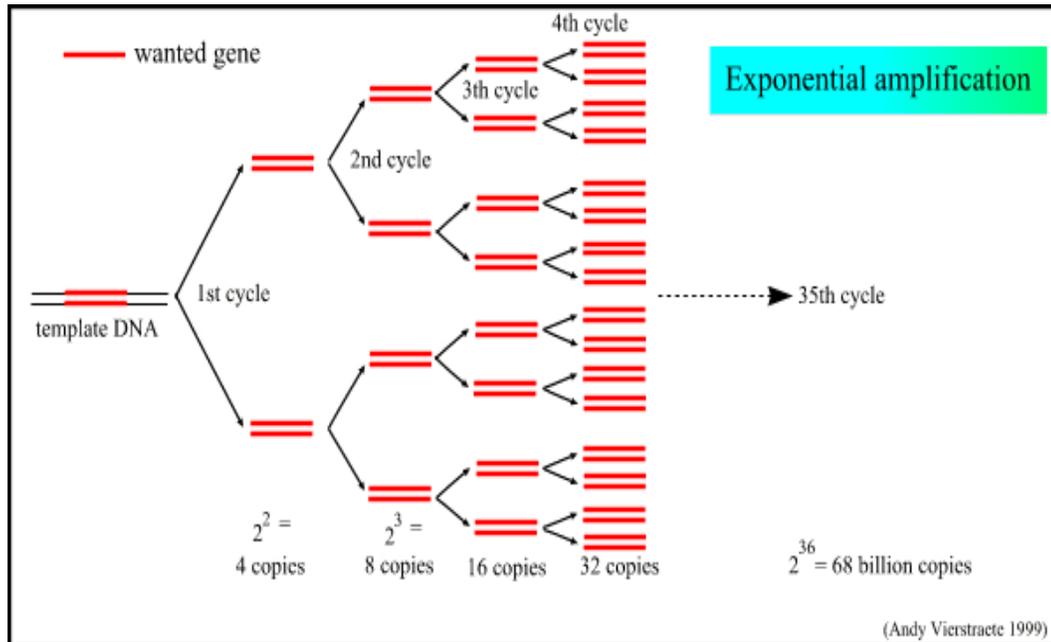
Primer mengalami goncangan akibat gerak Brownian. Ikatan-ikatan ionik secara konstan dibentuk dengan memecahkan ikatan antara untai tunggal primer dan untai tunggal template. Ikatan sangat stabil terjadi pada jarak pendek (dimana primer menempel) dan pada bagian pendek tersebut terbentuk untai ganda DNA (*template* dan *primer*), enzim polymerase dapat melekatkannya dan mulai mengkopi *template*. Ikatan ionik antara primer dan template sangat kuat dan tidak dapat dipecahkan oleh apapun .

c. Extension pada suhu 72°C

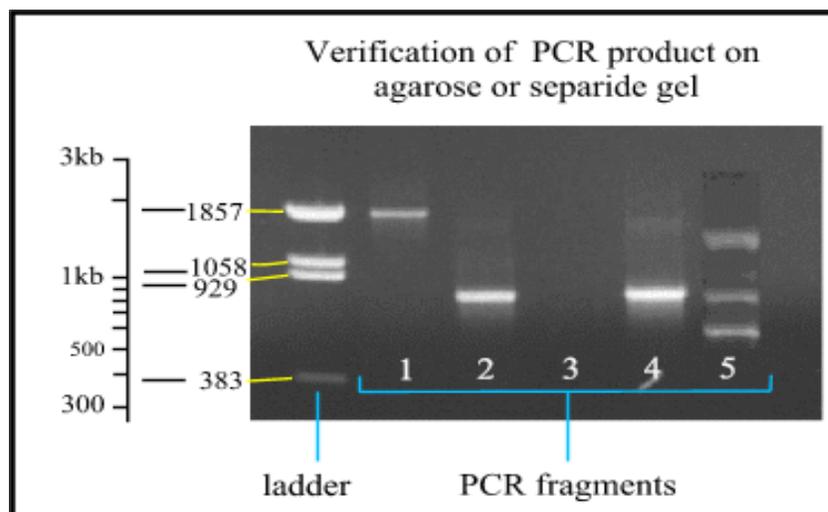
Suhu ini adalah suhu ideal untuk pekerjaan polymerase. Primer dengan bantuan DNA polymerase akan membentuk untai DNA. Proses saling melengkapinya template dimulai pada primer side 3' (polymerase ditambahkan dNTPs dari 5' ke 3', dibaca template dari side 3' ke 5', berdasarkan penambahan saling melengkapi pada template) (Andy Vierstrete, 1999)



Gambar 4. Tahap-tahap dalam Proses PCR (Andy Vierstrete, 1999)



Gambar 5. Perbanyak Gen dalam PCR Berlangsung Secara Eksponensial (Andy Vierstrete, 1999)



Gambar 6. Produk PCR pada Gel Agarosa (Andy Vierstrete, 1999)

3. Komponen pada Proses PCR

Empat komponen utama yang digunakan dalam proses PCR adalah (1).DNA cetakan yaitu hasil isolasi fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2). Oligonukleotida primer yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3). Enzim DNA Polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, (4). Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP sebagai sumber nukleotida. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Yuwono, 2006).

4. Deteksi dan Analisa Hasil PCR

Hasil PCR dapat dilihat dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa. Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah jika molekul DNA yang bermuatan negatif ditempatkan pada penghantar listrik (buffer), molekul tersebut akan bergerak menuju ke muatan positif. Molekul DNA yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dari pada yang berukuran besar. Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*) yang salah satunya didapat dari lambda yang telah dipotong oleh enzim restriksi (Dawson dkk, 1996 *dalam* Muladno, 2001).

Selanjutnya untuk dapat melihat dan menganalisa hasil elektroforesis, DNA di dalam gel agarose diwarnai (*staining*) dengan menggunakan ethidium

bromide (EtBr) yaitu zat pewarna yang dapat berfluoresensi di bawah sinar ultraviolet. EtBr dapat menyisip di antara basa-basa DNA serta membuat rantai DNA menjadi kaku. DNA hasil amplifikasi tampak sebagai pita yang jelas dan terang apabila gel agarose yang membawa DNA tersebut ditempatkan di atas sinar ultra violet (Sambrook dkk. *dalam* Muladno, 2001)

5. Macam-macam PCR

Macam-macam PCR berdasarkan kegunaanya antara lain ; (Putra, 1997)

1. Multipleks PCR

Teknik ini menggunakan beberapa pasang primer yang spesifik untuk target yang berbeda pada suatu amplifikasi DNA yang sama. Koamplifikasi ini mempunyai beberapa tujuan. (1) Dapat mendeteksi adanya kelainan pada sekuens DNA yang panjang. (2) Dapat menguji segmen dari target genom yang tidak terkait. (3) Sebagai kontrol internal. (4) untuk menguji multi patogen dari spesimen tunggal dengan biaya lebih murah.

2. Deteksi poin mutasi

The amplification refractory mutation system (ARMS) menggunakan primer dengan 3' yang *mismatch* dan polymerase yang telah kehilangan aktivitas eksonukleasenya (3' ke 5'). Jika terjadi *mismatch*, maka reaksi PCR akan berjalan. ARMS ini dapat digunakan untuk mendeteksi *point mutation* yang pada penderita HIV positif yang resisten terhadap acidothymidine.

3. Determinasi Sekuen

Determinasi sekuens dari DNA *sequencing* pada laboratorium mikrobiologi klinik memegang peranan yang penting. Teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi mutan dari virus hepatitis B yang berkaitan dengan keprogresifan sampai dengan fulminan hepatic nekrosis.

4. *Nested amplification*

Dalam suatu protokol *nested amplification*, pada putaran pertama amplifikasi digunakan sepasang *primer* dan amplifikasi dilakukan sebanyak 15-30 siklus. Produk dari amplifikasi putaran pertama ini dipindahkan ke tabung lain dan PCR ke dua dijalankan dengan menggunakan sepasang *primer* yang spesifik terhadap internal *sequence* dari produk PCR yang dihasilkan pada putaran pertama. PCR putaran kedua dilakukan sebanyak 15-30 siklus, kemudian dideteksi dengan gel elektroforesis. Keuntungan metode ini adalah sensitifitasnya yang sangat tinggi. Kadang tanpa hibridisasi menggunakan probe, *single copy* dari target dapat dideteksi.

5. Deteksi Target RNA

Template RNA dapat dideteksi dengan PCR jika ekstrak RNA terlebih dahulu diubah menjadi c-DNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*.

6. PCR kuantitatif

Hubungan linear antara jumlah *copy* input dan level dari produk PCR biasanya berkisar antara pembesaran 3 sampai 4 kali. Faktor yang berpengaruh pada PCR kuantitatif ini antara lain; optimasi protokol untuk mendapatkan efikasi maksimal, menghindari siklus yang berlebihan, penyiapan sampel sebaik mungkin dan menyertakan internal standard.

6. Faktor-faktor yang Menentukan Keberhasilan PCR

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu :

- a. deoksiribouklotida triphosphat (dNTP)
- b. oligonukleotida primer
- c. DNA template (cetakan)
- d. Komposisi larutan buffer
- e. Jumlah siklus reaksi
- f. Enzim yang digunakan
- g. Faktor teknis dan non teknis misalnya kontaminasi

Keunggulan metode PCR adalah kemampuannya dalam melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga dapat mencapai 10^9 kali lipat. Dengan demikian, kontaminasi fragmen DNA dalam jumlah sangat sedikit sekalipun dapat menyebabkan terjadinya kesalahan yaitu dengan didaptkannya produk amplifikasi yang tidak diinginkan. Kontaminasi tersebut dapat berasal dari beberapa sumber, antara lain dari reaksi-

reaksi PCR yang dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu, dalam melakukan PCR perlu diperhatikan beberapa hal seperti berikut;

Deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP)

Larutan stok dNTP yang akan digunakan dalam PCR sebaiknya dinetralkan menjadi pH 7,0. Untuk menentukan konsentrasinya sebaiknya digunakan metode spektroskopi. Larutan stok tersebut kemudian perlu dituang dalam volume kecil (aliquot) dengan konsentrasi 1mM dan disimpan pada suhu -20°C . konsentrasi masing-masing dNTP yang diperlukan dalam PCR berkisar antara 20 – 200 μM dan keempat dNTP yang digunakan sebaiknya mempunyai konsentrasi yang sama untuk memperkecil kemungkinan kesalahan penggabungan nukleotida selama proses polimerisasi. Sebagai patokan, konsentrasi masing-masing dNTP sebesar 20 μM dalam 100 μM secara teoritis cukup menyintesis 2,6 μg atau 10 pmol DNA yang mempunyai panjang 400 bp (Gelfand dan White, 1990 dalam Yuwono, 2006)

Oligonukleotida primer

Konsentrasi primer yang optimal berkisar antara 0,1 – 0,5 μM (Gelfand dan White, 1989 dalam Yuwono, 2006) meskipun konsentrasi primer sampai 1,0 μM masih dapat menghasilkan produk yang sangat spesifik (Yuwono, 1991). Konsentrasi primer yang lebih tinggi dari 1,0 μM dapat menyebabkan terakumulasinya hasil polimerisasi non spesifik. Panjang oligonukleotida yang digunakan sebagai primer umumnya 18 –

29 nukleotida dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60%. Sekuen oligonukleotida primer sebaiknya dicek apakah mempunyai kemungkinan membentuk hibrid antara primer yang satu dengan primer yang lain. Disamping itu, jika memungkinkan sebaiknya dihindari pula rancangan primer yang mempunyai nukleotida C atau G secara berurutan tiga atau lebih pada ujung 3' karena hal ini dapat menyebabkan kesalahan peng-awal-an (*mispriming*) terutama pada daerah-daerah yang kaya akan sekuen G + C (Gelfand dan White, 1990 dalam Yuwono, 2006)

Urutan sekuen oligonukleotida *primer* dapat berupa urutan yang dapat berhibridisasi secara spesifik dengan suatu molekul DNA cetakan atau dapat bersifat universal. Primer universal adalah suatu primer yang komplementer dengan suatu sekuen nukleotida yang umum terdapat dalam banyak molekul DNA sehingga dapat berhibridisasi dengan bermacam-macam DNA cetakan. Sebagai contoh, gen yang mengkode RNA ribosom pada bakteri mengandung suatu urutan nukleotida yang terdapat pada semua bakteri. Dengan demikian, primer universal dapat dirancang sehingga bersifat komplementer dengan sekuen tersebut.

DNA Cetakan

DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 – 10^6 molekul. DNA cetakan yang digunakan dapat berupa DNA yang sudah dimurnikan dengan sentrifugasi gradien CsCl maupun dengan menggunakan sel yang dicampur dengan komponen PCR yang lain. Pada

waktu suhu inkubasi PCR mencapai 95⁰C, yang dimaksudkan untuk mendenaturasi DNA, sudah cukup untuk merusak sel yang memungkinkan oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang ada dalam sel. DNA yang digunakan sebagai cetakan dapat berupa rantai tunggal maupun rantai ganda. Efisiensi amplifikasi biasanya lebih tinggi jika menggunakan molekul DNA yang sudah dilinierkan dengan suatu enzim restriksi tertentu dari pada kalau menggunakan molekul DNA yang berbentuk sirkular (Sambrook , 1989 dalam Yuwono, 2006)

Larutan Buffer

Buffer yang dianjurkan untuk melakukan PCR adalah 10 – 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 – 8,8 (pada suhu 20⁰C). untuk membantu proses penempelan primer (*primer annealing*), dapat juga ditambahkan KCl sampai konsentrasi 50 mM. di atas konsentrasi ini, KCl justru akan menghambat aktifitas Taq DNA polymerase. Di samping itu perlu juga ditambahkan 1,5mM MgCl₂. Komponen lain yang perlu ditambahkan adalah gelatin atau BSA (bovine serum albumin) sebanyak 0,1 % (berat/volume) dan deterjen non ionik seperti Tween 20 sebanyak 0,05 – 0,1% untuk mempertahankan kestabilan enzim Taq DNA polymerase.

Siklus Reaksi

Pada umumnya PCR dilakukan dengan mengulangi siklus reaksi pelipatgandaan sebanyak 20 – 30 kali siklus. Akan tetapi, banyaknya siklus yang diperlukan tergantung terutama pada konsentrasi awal

molekul DNA target yang akan dilipatgandakan. Siklus yang terlalu banyak justru akan meningkatkan konsentrasi produk yang tidak spesifik, sedangkan siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan.

Siklus PCR dilakukan dengan beberapa kondisi suhu yang berbeda. Pada akhir siklus biasanya dilakukan inkubasi tambahan pada suhu pemanjangan primer (biasanya pada suhu 72⁰C jika digunakan Taq polymerase) selama 5 – 15 menit untuk menyempurnakan proses polimerisasi.

Enzim yang Digunakan

Beberapa macam enzim yang dapat digunakan untuk melakukan PCR antara lain Taq DNA Polimerase, Tth DNA Polimerase, Pwo DNA Polimerase, Pfu dan Tli DNA Polimerase. Secara umum konsentrasi enzim yang dianjurkan untuk melakukan PCR adalah 2,5 unit/reaksi. Sering penggunaan 1 unit enzim Taq polymerase sudah optimum untuk melakukan PCR dengan jumlah siklus reaksi 20 – 25 kali. Untuk siklus yang lebih banyak maka sebaiknya digunakan unit yang lebih besar pula, tetapi sebaiknya tidak melebihi 2,5 unit karena konsentrasi enzim yang terlalu tinggi akan menurunkan spesifitasnya.

Pemisahan Pekerjaan PCR dari Reaksi Lain

Jika memungkinkan, sebaiknya tempat untuk melakukan PCR dipisahkan dari tempat untuk melakukan manipulasi genetik yang lain. Pekerjaan manipulasi genetik, misalnya ligasi dan analisis restriksi, merupakan sumber kontaminasi yang paling potensial karena akan melibatkan fragmen-fragmen DNA. Jika fragmen-fragmen DNA tersebut mengontaminasi tabung yang digunakan untuk melakukan PCR misalnya, hal ini dapat memberikan hasil positif palsu. Untuk menghindari hal ini sebaiknya PCR dilakukan di dalam ruangan khusus.

Penyimpanan Reagensia

Reagensia atau bahan kimia yang digunakan untuk PCR sebaiknya disiapkan tersendiri dan dituang di dalam tabung-tabung khusus. Volume reagensia yang disimpan dalam tabung-tabung tersebut diusahakan tidak terlalu besar sehingga kalau dibuang karena adanya kontaminasi tidak terlalu merugikan. Sebaiknya tabung-tabung yang berisi reagensia untuk PCR diberi nomor dan nomor tersebut dicatat pada waktu melakukan PCR. Dengan demikian, kalau terjadi kontaminasi maka sumber kontaminasinya akan mudah ditelusuri kembali. Oligonukleotida yang digunakan untuk PCR sebaiknya disintesis di dalam tabung-tabung yang bebas dari fragmen-fragmen DNA yang lain.

Pipet

Pipet dan tip yang digunakan untuk mengambil reagensia adalah sumber kontaminasi yang rawan. Oleh karena itu, sebaiknya digunakan *positive displacement pipettes* yaitu suatu pipet yang menggunakan tip khusus. Tip khusus tersebut mempunyai *plunger* didalamnya yang digunakan sebagai penekan cairan yang akan dimasukkan ke dalam tabung dan sekaligus memisahkan cairan reagensia dari pipet mikro penyedotnya sendiri sehingga tidak ada kemungkinan cairan reagensia tersebut masuk ke dalam pipet mikro penyedotnya. Perlu diketahui bahwa pipet mikro penyedot yang digunakan untuk manipulasi genetik sering terkontaminasi oleh fragmen-fragmen DNA terutama pada bagian dinding sebelah dalamnya.

Kecermatan dalam Teknik Laboratorium

Faktor lain yang perlu diperhatikan dalam melakukan PCR adalah kecermatan atau ketelitian terutama dalam hal penanganan sampel. Usaha untuk mencegah kontaminasi silang antar sampel dilakukan dengan selalu memakai sarung tangan dan gantilah sarung tangan tersebut jika sudah terkontaminasi oleh komponen tertentu. Usaha lain yaitu mencegah cipratan komponen reaksi dari tabung saat dibuka atau ditutup. Sebelum tabung yang berisi komponen reaksi dibuka, sebaiknya disentrifugasi secara cepat sehingga seluruh komponen ada di bagian bawah, sehingga tidak menciprat keluar saat dibuka.

Penggunaan control

Untuk mengecek ada tidaknya kontaminan di dalam komponen reaksi yang digunakan, sebaiknya digunakan kontrol. Caranya adalah dengan mencampurkan komponen-komponen reaksi seperti biasa, tetapi tidak ditambahkan DNA cetakan, kemudian dilakukan inkubasi seperti biasa. Selain itu, dapat juga digunakan kontrol yang lain yaitu suatu fragmen DNA, seperti DNA plasmid, yang secara teoritis bukan merupakan DNA cetakan. Gunakan fragmen DNA tersebut untuk menggantikan DNA cetakan dalam reaksi kontrol.

Sumber Kontaminasi yang Lain

Beberapa faktor yang juga merupakan sumber kontaminasi adalah;

- (1). DNA plasmid atau *phage* yang mengandung sekuen target yang akan diamplifikasi.
- (2). Fragmen DNA restriksi yang telah dipurifikasi dan akan digunakan sebagai sekuen target. Jika fragmen restriksi tersebut diisolasi dari gel agarosa maka sebaiknya alat elektroforesis yang akan digunakan untuk memisahkan fragmen tersebut direndam dulu dalam larutan 1 N HCl. Sebaiknya digunakan pisau yang masih baru untuk memotong fragmen dari gel. Pada waktu memotong fragmen DNA dari gel, letakkan di atas plastik sehingga gel tersebut tidak menempel langsung pada transiluminator UV yang digunakan untuk mengetahui letak fragmen DNA.
- (3). Mesin sentrifugasi.
- (4). Campuran es kering– etanol yang digunakan untuk mengendapkan DNA (Yuwono, 2006)

7. Manfaat Teknik PCR Dalam Dunia Kesehatan

PCR merupakan cara yang demikian cepat dan sangat esensial dalam meningkatkan derajat kesehatan dan kehidupan manusia. Penelitian kesehatan dan kedokteran klinik menitik beratkan PCR pada dua bidang yaitu mendeteksi organisma penyebab infeksi dan mendeteksi variasi dan mutasi gen, khususnya gen manusia. Hal ini dikarenakan PCR dapat memperbanyak sekecil apapun jumlah DNA dari hanya satu sel yang diperoleh dokter atau peneliti dari hasil eksaminasi sel sperma tunggal atau hasil ekstraksi suatu penyebab infeksi.

Metode ini khusus digunakan untuk menemukan organisma penyebab penyakit yang sangat sulit atau tidak mungkin ditemukan dengan kultur. Banyak kelompok mikroorganisma; bakteri, fungi dan virus menyebabkan kasus seperti tuberkulosa, klamidia, viral meningitis, viral hepatitis, AIDS dan sitomegalovirus dapat dideteksi dengan PCR. Dalam hal ini jumlah genetik dari material sampel diperbanyak sampai jumlah yang dapat digunakan untuk identifikasi. Contohnya, mendeteksi virus AIDS sesegera mungkin selama minggu-minggu awal infeksi dengan hasil yang lebih baik dari tes ELISA. PCR langsung memperlihatkan bagian DNA dari virus, malahan lebih baik dari pada standar tes yang digunakan sebelumnya dimana hanya memperlihatkan secara tidak langsung keberadaan virus dengan mencari antibodi yang dibuat oleh tubuh akibat bahan infeksi tersebut. (Powledge, 1999)

8. PCR – RFLP

Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP) merupakan teknik yang digunakan untuk merestriksi untaian DNA yang telah diamplifikasi oleh mesin PCR, dengan menggunakan enzim restriksi. Teknik ini telah banyak digunakan untuk mendeteksi terjadinya mutasi gen yang ditandai dengan perubahan urutan nukleotida dari asam amino penyusun DNA gen tertentu.

Menurut Takara (2005), enzim restriksi *Hinf I* akan merestriksi untaian DNA pada pasangan asam amino GATC – CTNAG menjadi :

-----G dan ANTC-----
 -----CTNA C-----

Dalam hal ini N menunjukkan jenis nukleotida apa saja. Pada untaian DNA *Par E* dari *S. typhi* Enzim *Hinf I* akan memotong untaian DNA pada urutan nukleotida **GACTC menjadi G||ACTC.**

Enzim *Hinf I* diperoleh dari *Haemophilus Influenza*. Konsentrasi bervariasi dari 4 – 12 unit/ μ l hingga konsentrasi tinggi yaitu 30-60 unit/ μ l. Temperatur reaksi dari enzim ini adalah 37^oC, yang mana aktifitas enzim ini tidak dipengaruhi oleh enzim *methylase*.

9. GEN BANK – POSISI PRIMER DAN RESTRIKSI

Berdasarkan Akasaka, 1999 dalam *GenBank* NCBI *S. Typhi* (gi 4176380) AB003429, untaian DNA sub unit topoisomerase IV khususnya *Par E*. Primer yang digunakan adalah sebagai berikut ;

Par E Forward :

5' - CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA - 3', dan

Par E Reverse:

5'- TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA -3' akan menempel pada posisi nukleotida 1223 – 1250 dan 1814 - 1787 . Panjang urutan nukleotida yang akan diamplifikasi adalah 591 bp. Dengan menggunakan enzim restriksi *Hinf I* (yang berasal dari *Haemophilus Influenza*) maka untaian DNA akan terpotong pada posisi nukleotida 1453 – 1454. Sehingga pemotongan oleh enzim restriksi akan menghasilkan dua fragmen dengan panjang fragmen masing-masing 230 bp dan 361 bp.

I. GEN

1. Organisasi Gen

Informasi genetika tersimpan sebagai suatu urutan basa pada DNA. Kebanyakan molekul DNA adalah rantai ganda, dengan basa-basa komplementer (A-T; G-C) berpasangan menggunakan ikatan hidrogen pada pusat molekul. Pasangan-pasangan basa tersusun dalam bagian pusat double

heliks dan menentukan informasi genetiknya. Panjang molekul DNA tersusun dalam ribuan pasangan basa. Keseluruhan dimensi sel bakteri diperkirakan 1000 kali lebih kecil daripada panjangnya tersebut, sehingga terbentuk lipatan yang melipat lagi, atau *supercoiling*, menyusun struktur fisik dari molekul *in vivo*.

Ribonucleic acid (RNA) pada umumnya dalam bentuk rantai tunggal. Basa *uracil* (U) pada RNA seperti *thymine* (T) pada DNA membantu fungsi hidridisasi, sehingga basa-basa komplementer yang menentukan struktur RNA adalah A-U dan C-G. Keseluruhan struktur dari molekul RNA rantai tunggal ditentukan oleh hibridisasi di antara urutan basa dalam lipatan (*loops*), membentuk struktur utuh yang mampu mengekspresikan informasi genetik yang terkandung dalam DNA.

Fungsi utama RNA adalah komunikasi dari susunan gen DNA ke ribosom dalam bentuk *messenger* RNA (mRNA). Ribosom yang mengandung RNA (rRNA) dan protein-protein, menterjemahkan pesan ke dalam struktur *primer* dari protein-protein perantara *aminoacyl transfer* RNA (tRNA) (Brooks dkk, 2001)

Kebanyakan gen prokariota terdapat pada kromosom bakteri. Data susunan genom prokariota terdiri dari satu molekul DNA sirkuler yang mengandung DNA 580 – 4600 kbp. Banyak bakteri mengandung gen-gen tambahan pada plasmid dengan ukuran bervariasi dari beberapa kbp sampai

100 kbp. Membran tidak memisahkan gen bakteri dari sitoplasma seperti pada eukariotik (Brooks dkk, 2001).

2. Mutasi Gen

Mutasi adalah perubahan susunan DNA. Mutasi spontan pada gen termasuk substitusi basa, delesi, insersi dan penataan. Substitusi basa dapat timbul sebagai akibat *mispairing* antara basa komplementer selama replikasi.

Banyak substitusi basa menghindari deteksi pada tingkat fenotip karena tidak menghilangkan fungsi dari produk gen. Contohnya mutasi *missence*, yang mengakibatkan substitusi satu asam amino, tanpa mempengaruhi efek fenotipnya. Mutasi *nonsense* menghentikan sintesis protein-protein, menghasilkan suatu protein terpotong pada tempat mutasi. Produk gen mutasi *nonsense* pada umumnya tidak aktif.

3. Deteksi Mutasi Gen

Dewasa ini deteksi mutasi gen dapat dilakukan sampai tingkat sekuensing nukleotida, tidak hanya pada hibridisasi DNA atau teknik manipulasi dan amplifikasi DNA secara *in vitro*.

Metode untuk mendeteksi mutasi kecil dan poin mutasi dikelompokkan dalam dua grup yaitu :

- a. Deteksi mutasi spesifik pada lokasi spesifik yang telah diidentifikasi dan disekuensing (metode diagnostik)
- b. Deteksi adanya perbedaan sekuensing yang tidak diketahui dari urutan panjang DNA yang diberikan.

Deteksi mutasi yang diketahui dapat dilakukan dengan cara

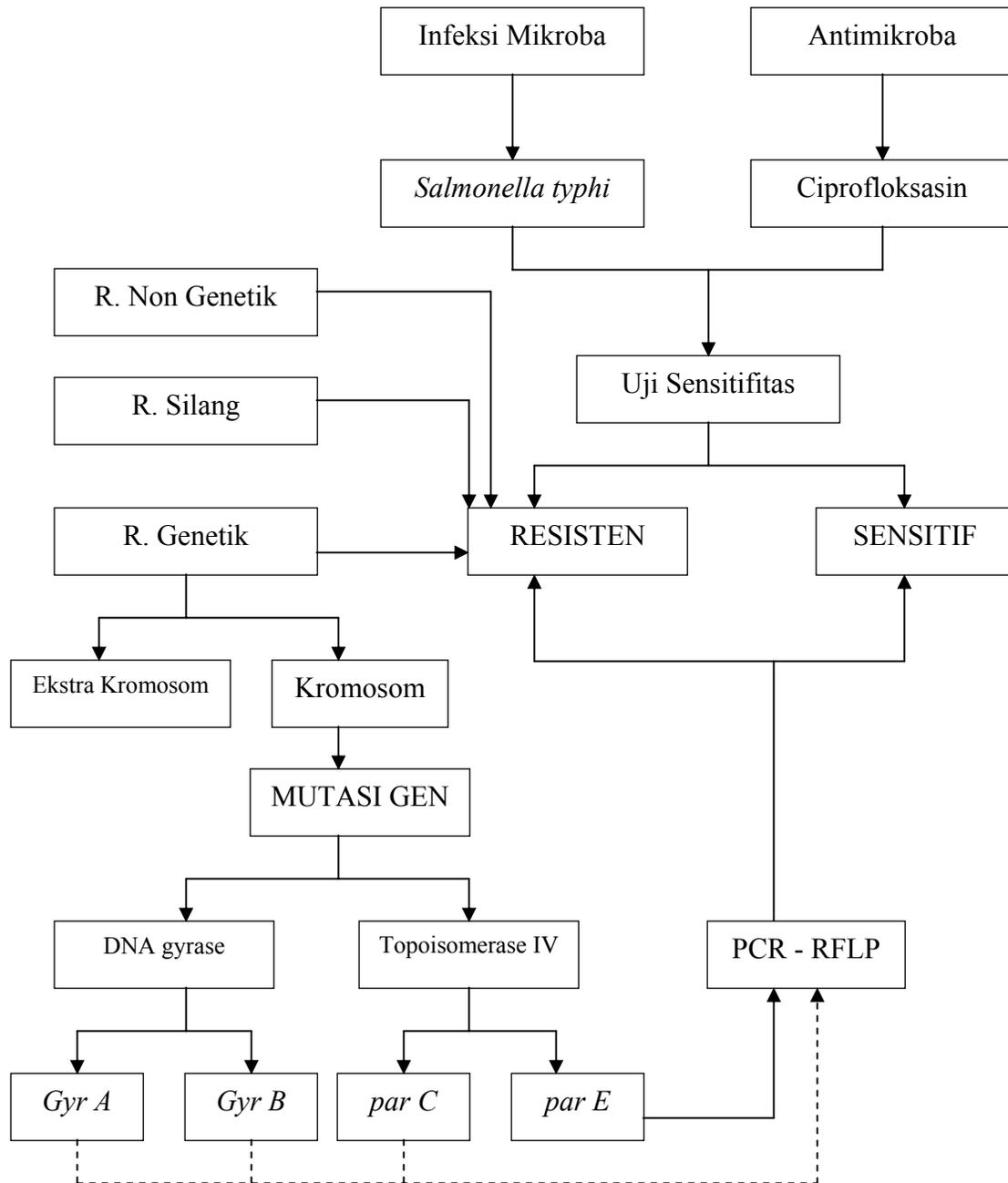
1. Metode berdasarkan PCR, yaitu : mendeteksi ada atau tidak adanya produk PCR yang diinginkan, sebagai penentu sekuen normal atau termutasi; mendeteksi perubahan ukuran produk PCR dan mendeteksi kesesuaian alel spesifik pada proses PCR.
2. Metode berdasarkan hibridisasi, yaitu menurunkan suhu hibridisasi sehingga hanya *probe matched* (probe yang sesuai) yang bisa terikat pada target.
3. Metode berdasarkan enzim yaitu : pemotongan DNA dengan enzim restriksi; memodifikasi enzim DNA *methylase* dan *ligase*; mengekstensi *primer* khusus pada *template* yang telah dilabel.

Deteksi mutasi yang tidak diketahui, dapat dilakukan dengan mendeteksi kesesuaian (*mismatch*) untai ganda misalnya mendeteksi heterodupleks oleh elektroforesis dan menganalisis DNA untai tunggal dengan sekuensing.

Dasar deteksi mutasi gen yang diketahui adalah penggunaan primer yang spesifik untuk menyeleksi sekuen yang akan diamplifikasi selama proses PCR dan pemberian label probe pada produk PCR yang akan diamplifikasi (Yap dan McGee dalam Griffin, 2000)

J. KERANGKA KONSEP

Konsep yang mendasari penelitian ini meliputi hubungan infeksi mikroba dengan antimikroba dalam hal ini *Salmonella typhi* dan ciprofloksasin. Hubungan ini ditentukan oleh sensitifitas bakteri terhadap antimikroba. Penyebab resistensi mikroba terhadap antimikroba salah satunya adalah mutasi gen. Konsep penelitian ini tergambar pada kerangka konsep dibawah ini.



Gambar Kerangka Konsep

K. HIPOTESA

Sebagai hipotesa dalam penelitian ini adalah :

- a. Deteksi mutasi gen *par E S. typhi* yang resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin, berdasarkan perbedaan pola gen setelah direstriksi dengan metode PCR-RFLP.
- b. Deteksi *S. typhi* yg resisten dan sensitif terhadap ciprofloksasin dapat dilakukan dengan teknik PCR dan *disc diffusion*.