

KESEHATAN

LAPORAN

Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch II
Tahun Anggaran 2009

KKA
KK
LP.178/110
Ana



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ANALISIS MUTASI *Gyr A* DAN *Gyr B* SEBAGAI MARKER RESISTENSI TERHADAP FLUOROQUINOLONE DARI *Salmonella enterica*

Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMk.
Dadik Raharjo, drh., M.Kes.
Dr. Garry Cores de Vries, drh., MS., M.Sc.
Dicky Bagus Widyatmoko, dr.
Daisuke Yanagi, MD
Prof. Toshiro Shirakawa, MD., PhD.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch II Nomor :
651/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juli 2009

Universitas Airlangga
Desember 2009.

RINGKASAN

Diare merupakan penyakit yang banyak menyerang orang Indonesia dan terutama anak usia dibawah dua tahun . *Salmonella enterica* merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi usus yang penting.

Penggunaan chloramphenicol yang intensif dapat menimbulkan bakteri *Salmonella* yang resisten maupun *multi drug resistant* (MDR) terhadap chloramphenicol, ampicillin, trimetropin. Penggunaan fluoroquinolone yang merupakan obat generasi baru jika tidak dilakukan secara baik dapat dengan cepat menimbulkan resistensi pada bakteri.

Fluoroquinolon bekerja dengan menghambat enzim DNA gyrase yang dikode oleh gen *gyr A* dan *gyr B*. Mutasi pada kedua gen ini dapat menyebabkan terjadinya resistensi pada bakteri. Analisis mutasi *gyr A* dan *gyr B* merupakan marker terjadinya resistensi terhadap quinolone ini.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat ketepatan penggunaan adanya mutasi *gyr A* dan *gyr B* pada *Salmonella enterica* sebagai marker terjadinya resistensi terhadap quinolone.

Untuk tujuan pemeriksaan laboratorium mikrobiologi klinik, analisis mutasi secara molekuler mempunyai kelebihan dibanding teknik konvensional berkaitan dengan kecepatan dan ketepatan dalam pemeriksaannya sehingga diharapkan dapat membantu pasien dalam penentuan pengobatan.

SUMMARY

Diarrhea is a disease that attacked many Indonesian people and especially children aged under two years. *Salmonella enterica* is one of the bacteria that cause intestinal infections is important.

Intensive use of chloramphenicol which *Salmonella* bacteria can cause a multi-drug resistant (MDR) to chloramphenicol, ampicillin, trimetropin. The use of a fluoroquinolone is the drug of new generation, if not done properly can quickly lead to resistance in bacteria.

Fluoroquinolone work by inhibiting the enzyme DNA gyrase encoded by the gene *gyr A* and *gyr B*. Mutations in two genes can cause resistance in bacteria. Mutation analysis of *gyr A* and *gyr B* is a marker of resistance to this quinolone.

This study aims to determine the appropriate usage of the mutation *gyr A* and *gyr B* in *Salmonella enterica* as a marker of resistance to quinolone, for the clinical microbiology laboratory, the molecular mutation analysis has advantage over conventional techniques associated with speed and accuracy in the investigation that is expected to assist patients in determining treatment.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena dengan rahmat dan ridho-Nya penelitian dan laporan penelitian ini dapat terselesaikan. Laporan ini disusun sebagai pertanggungjawaban penulis terhadap penelitian “Analisis Mutasi *Gyr A* dan *Gyr B* Sebagai Marker Resistensi Terhadap Fluoroquinolone dari *Salmonella enterica* ” yang telah diselesaikan. Kami berharap bahwa hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai masukan bagi peneliti yang berkecimpung pada bidang *Salmonella enterica* khususnya dan penelitian dalam bidang biologi molekuler umumnya.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam proses penelitian serta dalam penulisan laporan penelitian ini, yaitu kepada :

1. Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DP2M), Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan kepercayaan kepada kami untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Rektor Universitas Airlangga Surabaya melalui Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
3. Ketua Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya yang telah mengizinkan pemanfaatan peralatan dilingkungan LPT untuk pelaksanaan penelitian ini.
4. Semua pihak yang telah banyak membantu terselenggaranya kegiatan penelitian dan penyelesaian laporan penelitian ini.

Saran dan masukan yang membangun sangat kami harapkan demi kesempurnaan dari penelitian ini agar dapat memberikan manfaat bagi nusa dan bangsa Indonesia.

Surabaya, 11 Desember 2009

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Salmonella	3
2.2. Patogenesis	5
2.3. Fluoroquinolone	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
3.1. Tujuan Penelitian	7
3.2. Manfaat Penelitian	7
IV. METODE PENELITIAN	8
4.1. Isolasi dan Identifikasi <i>Salmonella enterica</i> dari feses penderita diare	8
4.2. Skrening mutasi <i>Gyr A</i>	9
4.3. Skrening mutasi <i>Gyr B</i>	9
4.4. Sequensing secara langsung	9
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	14
6.1. Kesimpulan	14
6.2. Saran	14
DAFTAR PUSTAKA	15
LAMPIRAN	17
1. Laboratorium	17
2. Peralatan Utama	17
2. Personalia Tenaga Peneliti	17
B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH	--
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	--

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1. Hasil kultur darah dari sampel penderita	10
5.2. Hasil uji sensitivitas isolat bakteri selama penelitian berlangsung terhadap beberapa antibiotika	10

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil PCR Salmonella	11
2. Hasil PCR Salmonella	12

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran	
1. Laboratorium	17
2. Peralatan Utama	17
3. Personalia Tenaga Peneliti	17

ANALISIS MUTASI *Gyr A* DAN *Gyr B* SEBAGAI MARKER RESISTENSI TERHADAP FLUOROQUINOLONE DARI *Salmonella enterica*

Oleh

Eddy Bagus Wasito., Dadik Raharjo., Garry Cores de Vries., Dicky Bagus Widyatmoko., Daisuke Yanagi., Toshiro Shirakawa.

I. PERMASALAHAN DAN TUJUAN PENELITIAN.

- 1.1. Perkembangan resistensi kuman terhadap antibiotik perlu dipantau agar dalam pengobatan penyakit diare dapat ditentukan jenis obat yang tepat. Telah terjadi resistensi yang cukup tinggi dari kuman *Salmonella* sp sebagai salah satu bakteri penyebab penyakit diare terhadap chloramphenicol, ampicillin dan kotrimoxazol yaitu sebesar 57%, 42% dan 71% secara berurutan.
- 1.2. Sampai saat ini belum ada publikasi dari *Salmonella enterica* dari Indonesia umumnya dan Surabaya khususnya tentang terjadinya mutasi pada gen *gyr A* dan *gyr B* yang merupakan marker terjadinya resistensi bakteri terhadap fluoroquinolone sehingga hasil penelitian dapat digunakan sebagai acuan bagi praktisi kesehatan dalam penggunaan fluoroquinolone dan juga publikasi internasional.

II. INOVASI IPTEKS.

Keberhasilan pemeriksaan terhadap mutasi pada gen *gyr A* dan *gyr B* di Indonesia merupakan hal yang penting guna mengadopsi perkembangan teknologi biologi molekuler dalam pemeriksaan terhadap keadaan suatu bakteri berkaitan dengan kelebihan teknologi biologi molekuler dalam hal kecepatan dan ketepatan hasil pemeriksaannya sehingga hasil pemeriksaan dapat lebih cepat dan dapat dipertanggungjawabkan.

III. KONTRIBUSI TERHADAP PEMBANGUNAN.

Hasil penelitian dapat digunakan sebagai acuan bagi para praktisi kesehatan sebagai data dasar untuk pemilihan antibiotika sehingga meningkatkan kehati-hatian dalam penggunaan antibiotika. Informasi adanya resistensi terhadap fluoroquinolone ini

penting artinya sebagai peringatan dini mengingat antibiotika ini merupakan obat baru yang bagi beberapa fihak dipersepsikan sebagai obat yang dapat menyelesaikan masalah jika terjadi kegagalan pengobatan dengan antibiotika generasi sebelumnya.

IV. MANFAAT BAGI INSTITUSI.

Pelaksanaan Penelitian ini melibatkan fihak Rumah Sakit sebagai sumber sampel untuk penelitian yang manfaatnya berupa : 1). Pasien mendapat pemeriksaan secara gratis, dilakukan sesuai tingkat untuk penelitian dan hasil yang lebih cepat. 2). Fihak RS dapat menggunakan data hasil penelitian sebagai data epidemiologi maupun data pelengkap untuk penelitian berbasis Rumah Sakit.

Penelitian ini melakukan kerjasama dengan Universitas Kobe – Jepang melalui program kerjasama CRC-ERID sehingga mempunyai cakupan aspek penelitian semakin luas dan dapat memperluas akses untuk publikasi ilmiah internasional maupun pengembangan bioproduk yang bermanfaat bagi bangsa dan Negara Indonesia.

V. PUBLIKASI ILMIAH.

Publikasi ilmiah direncanakan untuk dilakukan di luar negeri dengan bantuan supervisi dari para peneliti asing yang tergabung dalam proyek penelitian ini. Penelitian ini, merupakan penelitian kerjasama internasional dengan partner asing sehingga melalui kerjasama inilah diharapkan dapat dilakukan publikasi internasional dengan bantuan dari mitra asing.

BAB I PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Menurut data Badan Kesehatan Dunia (WHO), Diare adalah penyebab nomor satu kematian balita di seluruh dunia. Di Indonesia, diare adalah pembunuh balita nomor dua setelah ISPA (Infeksi Saluran Pernapasan Akut) dan setiap tahun 100.000 balita meninggal karena Diare, sementara UNICEF (Badan Perserikatan Bangsa-Bangsa untuk urusan anak) memperkirakan bahwa, setiap 30 detik ada satu anak yang meninggal dunia karena Diare (ESP, 2009).

Simanjuntak (1983), menyatakan bahwa agen penyebab diare di Indonesia yang didapat dari penelitian terhadap 1937 spesimens adalah *V. cholera* 01 50,2%, Rota virus 31,0%, ETEC 6,8%, *Campylobacter* sp 4,8%, *Salmonella* sp 4,3%, *V. parahaemolyticus* 1,6%, NAG 0,9%, *Shigella* sp 0,8%, *Y. enterocolytica* 0,2% dan infeksi campuran dari 2 atau 3 agent yang berbeda adalah sebesar 5%.

Penggunaan antibiotik secara tidak rasional pada penyakit diare telah menimbulkan resistensi kuman terhadap antibiotik. Perkembangan resistensi kuman terhadap antibiotik perlu dipantau agar dalam pengobatan penyakit diare dapat ditentukan jenis obat yang tepat. Pudjarwoto (2002), melaporkan adanya resistensi yang cukup tinggi dari kuman *Salmonella* penyebab penyakit diare terhadap chloramphenicol, ampicillin dan kotrimoxazol yaitu sebesar 57%, 42% dan 71% secara berurutan.

Salmonella adalah salah satu spesies bakteri yang paling luas dipelajari, meliputi fisiologi, genetik, struktur sel dan perkembangannya. *Salmonella* juga merupakan salah satu bakteri patogen yang secara luas dipelajari sifat-sifatnya dan penyebab utama terjadinya penyakit gastroenteritis akibat bakteri (Darwin and Miller, 1999)

Terjadinya *multi drug resistant* pada *Salmonella* ini, menyebabkan para praktisi kesehatan di Indonesia sudah mulai menggunakan fluoroquinolone untuk mengobati penyakit infeksi yang ada. Penggunaan fluoroquinolone harus disertai dengan pertimbangan yang kuat mengingat harga obat yang mahal dan merupakan generasi baru sehingga terjadinya resistensi akan menyulitkan pengobatan pada penderita.

Secara teoritis terdapat 3×10^{-11} kemungkinan untuk terjadinya resistensi terhadap bakteri yang mendapat paparan fluoroquinolon sehingga penggunaan yang intensif sangat memungkinkan untuk munculnya bakteri yang resisten. Resistensi terhadap fluoroquinolone ditandai oleh adanya mutasi pada gen *gyr A* dan *gyr B*.

Sampai saat ini belum ada publikasi dari *Salmonella enterica* dari Indonesia umumnya dan Surabaya khususnya tentang terjadinya mutasi pada gen *gyr A* dan *gyr B* yang merupakan marker terjadinya resistensi bakteri terhadap fluoroquinolone sehingga hasil penelitian dapat digunakan sebagai acuan bagi praktisi kesehatan dalam penggunaan fluoroquinolone dan juga publikasi internasional.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1. Salmonella.

Salmonella merupakan genus dari family Enterobacteriaceae yang bersifat gram negative, umumnya motil menggunakan flagella peritrichous, facultative anaerobe, mereduksi nitrat menjadi nitrit, menghasilkan gas dari d-glukosa, menghasilkan *hydrogen sulfide* dan *indole negative*, *Salmonella sp.* mempunyai hubungan yang dekat dengan *Escherichia coli* (Brenner *et al*, 2005).

Strain Salmonella dibedakan berdasarkan reaksinya terhadap serum, dan untuk beberapa puluh tahun setiap serotipe baru diberikan nama spesies, seperti *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum*, and *S. dublin*. Secara umum sekarang dapat diterima bahwa hanya terdapat satu spesies dari *Salmonella* yaitu *S. enterica* dibanding lebih dari 2000 nama. Tetapi masih banyak peneliti yang menulis “*S. typhimurium*” dibanding “*S. enterica* serovar Typhimurium”

Pada tahun 1999, diperkenalkan nama *Salmonella enterica* sebagai pengganti spesies dari *Salmonella choleraesuis*. Nama *Salmonella choleraesuis* dapat menimbulkan kebingungan karena nama ini juga digunakan sebagai nama untuk serotype atau serovar. Walaupun nama ini tidak diakui oleh International Committee of Systematic Bacteriology, diterima untuk digunakan oleh World Health Organization dan publikasi dari American Society for Microbiology (Chiu, 2004).

Salmonella mampu menyebabkan berbagai macam gejala penyakit seperti : demam enterik, bakterimia, enterokolitis, *focal infection*. Masa inkubasi umumnya 6 sampai 48 jam yang diikuti dengan pusing, rasa sakit pada perut, diare dan muntah. Diare dapat mengandung darah, limfosit dan mukus. Demam, lesu dan nyeri pada otot adalah sering terjadi. Gejala dapat hilang dalam satu minggu tetapi *Salmonella* dapat terus dikeluarkan bersama feses sampai 20 minggu pada anak umur 5 tahun dan selama 8 minggu dari orang

dewasa. Anak, terutama yang berumur 1 tahun dan mereka yang berumur lebih dari 60 tahun lebih peka terhadap penyakit ini dan cenderung menjadi infeksi yang lebih berat (Turnbull, 1979).

Di Amerika Serikat, kasus infeksi *Salmonella* dengan serotype nontyphoid *Salmonella* telah meningkat secara drastis yang menyerang antara 2 sampai 3 juta orang dengan angka kematian 500 sampai 2000 kematian pertahun (Altekruise *et al.*, 1997).

Terdapat sekitar 40.000 kasus salmonellosis yang dilaporkan per tahu di Amerika, hanya 1 – 5% infeksi dengan *Salmonella* yang dilaporkan, jadi sebenarnya terdapat 2 – 4 juta kasus di Amerika per tahun dengan perkiraan biayanya lebih dari 2 milyar dollar. Terjadi peningkatan secara nyata pada kejadian salmonellosis di Amerika sejak perang dunia ke 2. Penyebab dari hal ini adalah kompleks dan termasuk peningkatan perbandingan populasi berumur lebih dari 60 tahun, perubahan pertanian dan cara distribusi makanan, peningkatan konsumsi makanan mentah atau setengah matang, peningkatan jumlah orang yang menderita penyakit kronis atau *immunocompromised* dan kerusakan infrastruktur dari kesehatan masyarakat (Baird-Parker, 1990., Chalker and Blaser, 1988)

Penularan dari *Salmonella* ke manusia umumnya terjadi akibat mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi selain terjadi penularan dari manusia ke manusia dan dapat terjadi penularan secara langsung dari hewan ke manusia. Sumber penularan utama dari *Salmonella* adalah daging, daging ayam dan telur. Sejak dua puluh tahun terakhir ini terlihat adanya peningkatan peranan dari telur dan produk telur dalam penularan penyakit (Rodrigue *et al.*, 1990).

Telur dapat terkontaminasi akibat pecahnya kulit telur atau terjadi penularan transovarally dari ovarium atau oviduct ke kuning telur sebelum pembentukan kulit telur. Penularan jenis ini sulit untuk diberantas sebab ayam petelur umumnya tidak menunjukkan gejala klinis. *S. enteritidis* adalah sering menjadi penyebab kontaminasi di bagian dalam telur dan akibatnya terjadi peningkatan infeksi pada ayam dan juga pada manusia.

S. enteritidis menjadi penyebab salmonellosis yang secara kuantitatif menyaingi *S. typhimurium* sebagai penyebab Salmonellosis yang paling umum (Mishu *et al*, 1994).

2.2. Patogenesis

Langkah pertama terjadinya penyakit adalah penularan pada inang yang rentan, umumnya terjadi karena konsumsi makanan terkontaminasi. Perkiraan dari penelitian pada relawan menunjukkan bahwa 10^5 sampai 10^{10} bakteri diperlukan untuk terjadinya awal infeksi tetapi jumlah pastinya adalah bervariasi bergantung pada strain bakterinya, jenis makanan yang dikonsumsi bersamaan dengan bakteri dan kondisi fisiologis dari inang. Secara umum dipercaya bahwa sejumlah besar inokulan dibutuhkan untuk melalui keasaman lambung dan berkompetisi dengan flora normal di saluran cerna (Taylor *et al.* 1981., Glaser *and* Newman, 1982).

Dosis infeksi dapat berkurang dimana *Salmonella* dikonsumsi dengan makanan yang dengan cepat melewati lambung seperti cairan atau dengan makanan yang menetralkan keasaman lambung seperti keju, susu. Individu dengan pH lambung tinggi seperti orang tua, umumnya lebih sensitif untuk terjadi infeksi. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa tikus yang mendapatkan perlakuan awal dengan streptomycin, yang mana menurunkan jumlah flora normal, menurunkan dosis dari *Salmonella* yang dibutuhkan untuk menginfeksi sampai 50%, efek yang sama terlihat pada orang yang mendapatkan pengobatan antibiotik (Galyov, 1997).

Beberapa laporan menyatakan bahwa colon dibandingkan usus halus merupakan tempat utama terjadinya infeksi. Terdapat tingkat keparahan yang bervariasi mulai dari keadaan ringa sampai edema parah dengan infiltrasi dari leukosit polimorfonukleus dan monosis, peradangan focal pada lamina propria, degenerasi mukosa. Usus halus terlihat normal.

Gejala klinik pada kera yang digunakan sebagai hewan coba menunjukkan bahwa pada hari keempat, ileum, cecum, colon bagian bawah dan limfoglandula mesenterica

terjadi kolonisasi pada semua hewan sedangkan kolonisasi sporadis terjadi pada jejunum, hati dan limfa. Kolonisasi pada limfoglandula mesenterica masih terjadi pada semua hewan sampai hari ketujuh (Kent *et al.*, 1966).

2.3. Fluoroquinolone

Fluoroquinolone secara struktur berbeda dengan obat sejenis seperti nalidixic acid, oxolinic acid dan cinoxacin pada dua bentuk umum, terdapatnya atom fluorine pada posisi 6 dan substitusi suatu piperazinyl atau pyrrolidinyl pada posisi 7 dari inti quinolone (Crumplin *et al.*, 1984).

Target quinolone di bakteri adalah pada deoxyribonucleic acid (DNA) gyrase, suatu enzim bakteri yang sangat esensial, enzim ini merupakan anggota tipe II topoisomerase dan ada dua subunit A yang dikode oleh gen *gyr A* dan dua subunit yang dikode oleh gen *gyr B* dan topoisomerasi IV (terdiri dari dua sub unit, *ParC* dan *ParE*). Kedua enzim ini pada bakteri berperan penting, tetapi mereka mempunyai peranan yang berbeda dan overlapping didalam sel bakteri. DNA gyrase adalah suatu enzim yang bertanggungjawab untuk perkembangan negative superhelical twists yang umumnya ditemukan pada intrasel dan dibutuhkan untuk memulai dan propagasi dari DNA replication fork (Digranes *et al.*, 1988).

Quinolone adalah antibakteri yang berifat bakterisidal dan juga secara cepat menghambat sintesis DNA dan kemampuan untuk menghambat sintesis DNA berkorelasi dengan aktivitas antimikrobanya. Quinolone secara cepat menempel pada sintesis DNA pada replikasi sehingga mengganggu permulaan replikasi. Penggunaan obat ini mempunyai efek lainnya yang mungkin merupakan konsekuensi dari penghambatan DNA gyrase yaitu berupa kerusakan DNA bakteri sebab quinolone diketahui sangat kuat dalam menginduksi system DNA repair yang dikontrol oleh gen *lex A* (Pidcock *et al.*, 1987).

Resistensi bakteri terhadap quinolone terutama terjadi melalui mutasi kromosom pada tipe II topoisomerase yang membuat enzim kurang sensitif untuk dihambat oleh quinolone atau suatu perubahan yang berakibat pada akses dari obat ke t quinolone target topoisomerase, seperti peningkatan ekspresi pompa efflux sendiri atau pada bakteri gram negatif terjadi kombinasi dengan adanya pengurangan pada porin diffusion channels membran luar. Reduksi pada lesi tingkat DNA akibat pengurangan jumlah dari enzim target obat dapat berakibat terjadinya resistensi terhadap obat (Hooper, 2002).

Bab III.

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian.

- 3.1.1. Mendapatkan derajat keberhasilan kultur bakteri dari sampel darah pasien yang diduga menderita penyakit thypus
- 3.1.2. Mendapatkan data terjadinya resistensi terhadap Fluoroquinolone dari *Salmonella enterica* isolat dari Surabaya.
- 3.1.3. Menentukan mutasi *Gyr A* dan *Gyr B* sebagai marker terjadinya resistensi terhadap Fluoroquinolone pada *Salmonella enterica* isolat dari Surabaya.

3.2. Manfaat Penelitian.

- 3.2.1. Data informasi adanya *Salmonella enterica* isolat dari Surabaya yang resisten terhadap fluoroquinolone yang termasuk obat baru.
- 3.2.2. Mempercepat waktu pemeriksaan mikrobiologi klinik sehingga pasien lebih cepat mendapat pengobatan yang tepat.
- 3.2.3. Untuk publikasi internasional.

BAB IV.

METODE PENELITIAN

4.1. Isolasi dan Identifikasi *Salmonella enterica* dari feses penderita diare

- Spesimens di kultur pada Salmonella–Shigella agar plates dan semua koloni suspek dilakukan uji biokimiawi yang dilanjutkan dengan identifikasi secara serologi dengan Salmonella antisera set.
- Isolat yang positif dengan uji biokimiawi dan serologi dilakukan PCR. DNA diekstraksi menggunakan a QIAamp DNA Mini Kit (Levy *et al.* 2008), dengan primer forward, GAA GGG AAA TGA AGC TTT T 3'; tyv-reverse, 5' TAG CAA ACT GTC TCC CAC CAT AC 3'; -forward, 5' GTT ATT CAG CAT AAG GAG 3'; -reverse, 5' CTT CCA TAC CAC TTT CCG 3'; prt-forward, 5' CTT GCT ATG GAA GAC ATA ACG AAC C 3'; prt-reverse, 5' CGT CTC CAT CAA AAG CTC CAT AGA 3'; H-forward, 5' ACT CAG GCT TCC CGTAAC GC 3'; Hd-reverse,5' GGC TAG TAT TGT CCT TAT CGG 3'. (Yanagi *et al.*, 2009).
- PCR dikerjakan cara 20 µL campuran yang terdiri dari 10 µL of AmpliTaq Gold PCR Master Mix a, 0.5-µmol/L primer pair, and 2 µL DNA sample.
- Uji Sensitivity dilakukan dengan mengacu pada standart dari Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Lima koloni yang seragam diambil dan dimasukkan kedalam 1 ml PZ dan dengan menggunakan cotton swab dilakukan pengusapan secara merata pada permukaan media Muller Hinton II, ditunggu 15 menit dan ditempelkan antibiotika disk standar. Inkubasi dilakukan pada 37oC, semalam dan pembacaan dilakukan sesuai dengan standart yang digunakan oleh masing-masing produsen antibiotika disk standar.

4.2. Skrening mutasi *gyr A*

- Metode PCR-RFLP untuk skrening mutasi *gyrA* *Salmonella* sp. (Hirose et al. 2003).
- Suatu fragmen termasuk *gyrA* QRDR (quinolone resistance determining regions) diamplifikasi dengan PCR dengan primer *gyrA*-F, 5' TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC 3', and *gyrA*-Hinfl-as, 5' ATG TAA CGC AGC GAG AAT GGC TGC GCC ATA CGA ACG CTG GAG 3'.
- Dilakukan digestion untuk mengetahui adanya mutasi pada *Gyr A*.

4.3. Skrening mutasi *gyr B*. (Ince and Hooper 2003).

- Metode PCR untuk skrening mutasi *GyrB* *Salmonella* sp. (Ince and Hooper, 2003).
- Suatu fragmen termasuk *gyrB* QRDR (quinolone resistance determining regions) diamplifikasi dengan PCR dengan primer GYRB1 : 5' TAGACGATGTACTCAGT-GAAT 3' dan GYRB1R : 5' GTGGCATATCCTGAGTTATAT 3'. Hasil PCR menggunakan primer ini adalah sebesar 1002 bp.
- Dilakukan digestion untuk mengetahui adanya mutasi pada *gyr B*.

4.4. Sequensing secara langsung.

- Primer yang digunakan untuk sequencing terhadap *GyrA* adalah forward, 5' ATG AGC GAC CTT GCG AGA GAA ATT ACA CCG 3'; reverse, 5' TTC CAT CAG CCC TTC AAT GCT GAT GTC TTC 3'. Dan untuk *GyrB* adalah GYRB1 : 5' TAGACGATGTACTCAGTGAAT 3' dan GYRB1R : 5' GTGGCATATCCTGAGTTATAT 3'.

Bab V.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penderita dengan gejala demam dan didiagnosis oleh Dokter yang merawat sedang menderita sakit typhus dilakukan pengambilan darah untuk dilakukan pembiakan bakteri.

Hasil pemeriksaan kultur darah dapat dilihat pada tabel 5.1.

5.1. Hasil kultur darah dari sampel penderita :

Jumlah sampel	Positif	Salmonella	Lainnya
60 sampel	13 sampel	8 isolat	5 isolat

Hasil kultur darah dari 60 sampel darah dari penderita dengan gejala demam, 13 sampel terdapat pertumbuhan kuman pada agar BacT/ALERT (21,6%). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian di Jepang, yang menyatakan bahwa terdapat 147 sampel positif dari 547 sampel dari darah arteri (26,9%) dan 138 dari 1075 sampel darah vena (12,8%). Hasil positif dapat menjadi lebih tinggi bagi pasien yang sampel darahnya dikumpulkan beberapa kali pada hari yang sama dibanding pasien dengan satu sampel darah yang diuji (Tomoko, 2006). Sedangkan hasil penelitian di Philippines menunjukkan terdapat 32% hasil kultur positif dari total 4.699 sampel yang diuji (Abucejo, 2001).

5.2. Hasil Uji Sensitivitas Isolat Bakteri Selama Penelitian berlangsung Terhadap Beberapa Antibiotika

Bakteri	AM 10	TE 30	LVX 5	SXT	C 30	Cip 5	NA 30	IPM 10	CRO 30
SH 01	S	S	S	R	S	S	--	--	S
SH 02	R	S	S	R	S	S	--	S	S
SH 03	S	S	S	S	S	S	--	--	--
SH 04	S	S	S	S	S	S	--	--	--
SH 05	S	R	S	S	S	S	--	--	--
SO 07	I	R	S	S	I	S	I	S	R
SO 10	R	S	--	R	S	--	--	S	R
SO 11	R	S	--	R	S	--	--	S	R
SO 13	R	I	R	R	S	--	--	--	R
SO 14	R	R	S	R	R	S	R	S	I
SH 24	S	R	S	S	I	S	I	S	R
DS 29	R	R	S	R	R	S	R	S	I
DS 35	S	S	S	S	S	S	R	S	S

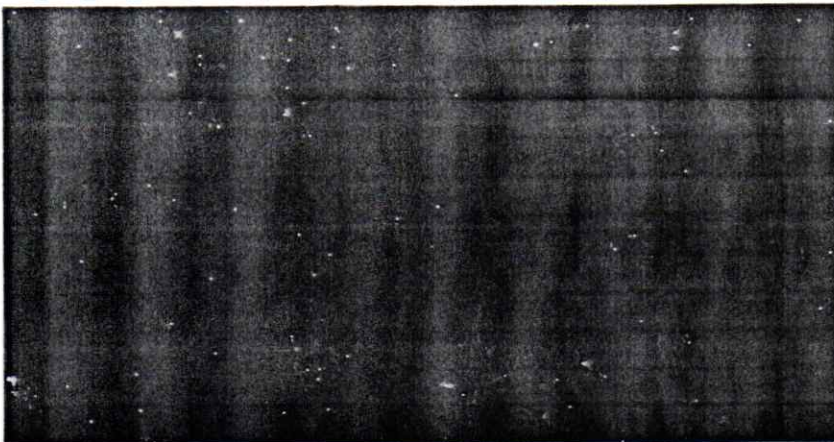
Semua bakteri yang didapat dari hasil perbenihan sampel darah dilakukan isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas terhadap antibiotika terhadap bakteri patogen yang didapat dengan maksud agar hasil penelitian ini secara langsung dapat membantu penanganan pasien ditinjau dari pemilihan obat yang lebih baik.

Hasil uji sensitivitas terhadap antibiotika menunjukkan bahwa terdapat beberapa isolat bakteri yang telah resisten terhadap beberapa jenis antibiotika, yaitu Ampisili, Tetrasiklin, Levofloksasin, Trimethoprim sulfamethoksazole, Asam Nalidiksik maupun kloramfenikol. Terdapatnya resistensi ini akan menimbulkan terbatasnya pilihan antibiotika yang dapat digunakan sebagai pengobatan terhadap pasien. Dua obat yang masih belum terjadi resistensi yaitu siprofloksasin dan imipenem yang merupakan antibiotika dengan harga cukup mahal.

Salmonella enterica yang berhasil dilakukan isolasi dan identifikasi selama penelitian ini berlangsung serta isolat *Salmonella enterica* yang telah disimpan di laboratorium Salmonella – Lembaga Penyakit Tropis dilakukan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk menentukan adanya mutasi pada Gyr A dan Gyr B yang merupakan marker untuk terjadinya resistensi pada antibiotika kelompok fluoroquinolone.

Hasil pemeriksaan dengan PCR dapat dilihat pada gambar 5.1.

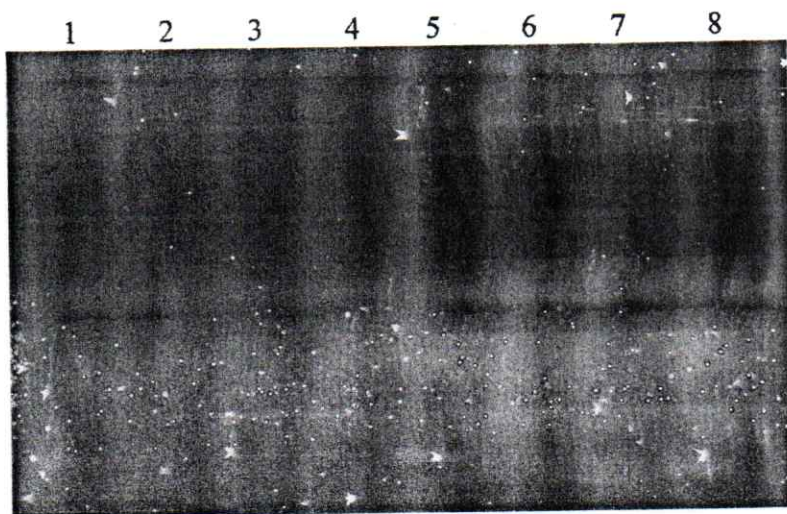
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Gambar 5.1. Hasil PCR Salmonella

Keterangan :

- Lane 1. : Sampel A 28
- Lane 2. : Sampel 2 ST
- Lane 3. : Sampel SO 13
- Lane 4. : Sampel 14 ST
- Lane 5. : Sampel 6 ST
- Lane 6. : Sampel 8 ST
- Lane 7. : Sampel 3 ST
- Lane 8. : Sampel J 369
- Lane 9. : Sampel J 733
- Lane 10 : Sampel 7 ST
- Lane 11 : Sampel 1 ST
- Lane 12 : Sampel 5 ST
- Lane 13 : Sampel 25 SS
- Lane 14 : Sampel J 440
- Lane 15 : Sampel 4 ST
- Lane 16 : Sampel EJ 669
- Lane 17 : Sampel J 437



Gambar 5.2. Hasil PCR Salmonella

Keterangan :

- Lane 1. : Sampel SH 02
- Lane 2. : Sampel 16 ST
- Lane 3. : Sampel 20 SS
- Lane 4. : Sampel SH 01
- Lane 5. : Sampel 17 SS
- Lane 6. : Sampel 16 SS
- Lane 7. : Sampel JT 09
- Lane 8. : Sampel 15 SS

Hasil pemeriksaan secara PCR menunjukkan adanya band yang bervariasi, beberapa sampel menunjukkan adanya pita tunggal diantaranya sampel SO 13, 14 ST, 6 ST, 5 ST, EJ

669, 17SS dan 15 SS, sedangkan sampel lainnya menunjukkan adanya dua pita, yaitu sampel A 28, 2 ST, 8 ST, 3 ST, 7 ST, 1 ST, 25 SS, J 440, 4 ST, J 437, SH 2 dan 16 ST, sedangkan sisanya menunjukkan hasil PCR dengan pita lebih dari 2 yaitu sampel 20 SS, SH 01, 16 SS dan JT 09. Adanya dua pita atau lebih pada elektroforesis hasil PCR dimungkinkan akibat adanya sekuens yang berulang pada DNA dari bakteri tersebut sehingga semua sekuens yang sama akan teramplifikasi dengan hasil adanya berbagai macam pita tergantung dari panjang DNA hasil amplifikasinya.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB VI.

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan.

1. Terdapat 13 pasien dengan kultur bakteri positif (21,6%), sedangkan sisanya tidak terdapat pertumbuhan bakteri meskipun pasien sudah didiagnosis menderita thypus.
2. Terdapat tiga isolat yang resisten terhadap antibiotika Fluoroquinolone, dua isolat lainnya mempunyai tingkat intermediate
3. Terdapat mutasi *Gyr A* dan *Gyr B* yang berkorelasi dengan terjadinya resistensi terhadap Fluoroquinolone pada *Salmonella enterica* isolat dari Surabaya.

6.2. Saran.

1. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan jumlah yang lebih banyak.
2. Penggunaan antibiotika fluoroquinolone harus dilakukan dengan pertimbangan yang rasional mengingat sudah terjadi resistensi pada *Salmonella enterica* isolat dari Surabaya.
3. Perlu dilakukan pemeriksaan terhadap adanya mutasi pada lokus-lokus lain yang berperan dalam timbulnya resistensi terhadap fluoroquinolone.

DAFTAR PUSTAKA

- Abucejo E., R.M. Capending., L.P. Socorro., A. Juanita., S.T. Lydia., R. Petri and H. Elja. 2001. Blood culture confirmed typhoid fever in a Provincial Hospital in the Philippines. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* 32 : 3., p. 531-536.
- Altekruse, S. F., M. L. Cohen, and D. L. Swerdlow. 1997. Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 3:285-293.
- Baird-Parker, A. C. 1990. Foodborne salmonellosis. *Lancet* 336:1231-1235.
- Brenner DJ., N R. Krieg., JT. Staley. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two. The Proteobacteria. Part B The Gammaproteobacteria.* springeronline.com.
- Chalker, R. B., and M. J. Blaser. 1988. A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 9:111-124.
- Chiu CH., LH. Su and C. Chu. 2004. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. *Clinical Microb. Reviews.* Vol. 17, No. 2. p. 311-322.
- Crumplin, G. C., M. Kenwright, and T. Hirst. 1984. Investigations into the mechanisms of action of the antibacterial agent norfloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 13(Suppl. B) :9-23.
- Digranes, A., E. Benonisen, A. Salveson, and F. Zahm. 1988. In vitro studies of fleroxacin (Ro 23-6240), a new trifluorinated quinolone derivative. *Chemotherapy (Basel)* 34:401-410.
- Darwin K.H and V. L. Miller. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 12, No.3. p. 405-428.
- ESP. <http://www.esp.or.id/handwashing/media/diare.pdf>
- Glaser, M. J. and L. S. Newman. 1982. A review of human salmonellosis. I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.* 34:1096-1106.
- Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvust, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges, and T. S. Wallis. 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eucaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.* 25:903-912.
- Hirose K, K. Tamura , H. Watanabe. 2003 Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Microbiol Immunol* 47:161-165. 320.

- Hooper, D. C. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.* 2:530–538.
- Ince D and D. C. Hooper. 2003. Quinolone Resistance Due to Reduced Target Enzyme Expression. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY.* p. 6883–6892.
- Kent, T. H., S. B. Formal and E. H. Labrec. 1966. Salmonella gastroenteritis in Rhesus monkeys. *Arch. Pathol.* 82:272–279.
- Mishu, B., J. Koehler, L. A. Lee, D. Rodrigue, F. Hickman-Brenner, P. Blake, and R. V. Tauxe. 1994. Outbreaks of Salmonella enteritidis infections in the United States, 1985–1991. *J. Infect. Dis.* 169:547–552.
- Phillips, I., E. Culebras, F. Moreno, and F. Baquero. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 20:631–638.
- Piddock, L. J. V., and R. Wise. 1987. Induction of the SOS response in Escherichia coli by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol. Lett.* 41:289–294.
- Pudjarwoto. 2002. Penelitian Pola Resistensi Bakteri Enteropatogen (Penyebab diare) terhadap Antibiotik. <http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbppk-gdl-res-2002-pudjarwoto-424-antbiotic>
- Rodrigue, D. C., R. V. Tauxe, and B. Rowe. 1990. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.* 105:21–27.
- Simanjuntak CH., M.A. Hasibuan; L.O. Siregar dan Iskak Koiman. 1983. Etiologi Mikrobiologis Penyakit Diare Akut. *Buletin Penelitian Kesehatan.* Vol. XI No. 2. http://www.litbang.depkes.go.id/Publikasi_BPPK/Buletin_BPPK/BUL83A.HTM
- Taylor, R. K., M. N. Hall, L. Enquist and T. J. Silhavy. 1981. Identification of OmpR: a positive regulatory protein controlling the expression of the major outer membrane matrix porin proteins of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 147:255–258.
- Tomoko T., Miki K., Eizo T., Akikazu U., Naoko H., Keisuke Y and Nahoko Y. 2006. Current Status of Blood Culture Tests at Our Hospital. *Medical Journal of Tsuyama Central Hospital.* 20 : 1, p. 45 – 48.
- Turnbull, P. C. B. 1979. Food poisoning with special reference to Salmonella. its epidemiology, pathogenesis and control. *Clin. Gastroenterol.* 8:663–714.
- Yanagia D., GC de Vries , D. Raharjo , L.Alimsardjono , EB. Wasito , Ismoedijanto S. Kinoshita , Y. Hayashia , H. Hotta , R. Osawaa , M. Kawabata, T. Shirakawa. 2009. Emergence of fluoroquinolone-resistant strain of Salmonella enterica serovar Typhi in Surabaya, Indonesia. www.elsevier.com/locate/diagmicrobio.
- Wolfson JS and DC Hooper. 1989. Fluoroquinolone Antimicrobial Agent. *Clinical Micro. Reviews.* Vol. 2. No. 4. p. 378 – 424.