

ABSTRAK

Deteksi Mutasi pada *Quinolone Resistant Determining Regions (QRDRs)* gen *gyrA* pada *Salmonella typhi* Isolat Klinik dan Galur Khas Indonesia

Kirby Saputra, 2008

Pembimbing I : Ernawati Arifin Giri Rachman, Ph.D

Pembimbing II : Johan Lucianus, dr., M.Si.

Hampir semua penelitian di berbagai negara endemis di Asia membuktikan bahwa mutasi pada *Quinolone Resistant Determining Regions (QRDRs)*, bagian gen *gyrA Salmonella typhi*, mengurangi sensitifitas pengobatan ciprofloksasin pada demam enterik. Letak mutasi dalam QRDRs dan ekspresinya pada asam amino berbeda pada tiap galur negara endemis. Dalam penelitian ini kami berusaha mencari hubungan antara penurunan sensitifitas terhadap fluorokuinolon dengan terjadinya mutasi DNA pada isolat klinik dan khas sampel *Salmonella typhi* Indonesia. Semua isolat diuji sensitifitasnya terhadap ciprofloksasin dengan menggunakan metode Kirby-Bauer *Disk Diffusion* kemudian dilakukan amplifikasi dengan PCR dan sekuensing nukleotida untuk mendeteksi penyimpangan pada QRDRs. Hasilnya yaitu 1 sampel yang sensitif fluorokuinolon tidak ditemukan mutasi DNA namun 2 isolat yang terbukti resisten terhadap fluorokuinolon juga tidak ditemukan mutasi DNA. Data hasil penelitian ini tidak menunjukkan adanya hubungan antara sifat resistensi sampel dan mutasi yang terjadi pada QRDRs gen *gyrA* DNA sampel. Sekuensing ulang disarankan untuk mengklarifikasi urutan nukleotida hasil penelitian ini.

Kata kunci : *Salmonella typhi*, QRDRs, fluorokuinolon, resistensi, mutasi

ABSTRACT

Detection of Mutations in The gyrA Quinolone Resistant Determining Regions (QRDRs) in Clinical dan Typical Strains of Salmonella typhi in Indonesia

Kirby Saputra, 2009

First tutor : Ernawati Arifin Giri Rachman, Ph.D

Second tutor : Johan Lucianus, dr., M.Si

Almost all researches in endemic regions in Asia proved that mutations in Quinolone Resistant Determining Regions (QRDRs), parts of gyrA gene of Salmonella typhi, reduce susceptibility of ciprofloxacin therapeutic in enteric fever. The sites of amino acid mutations in QRDRs in relation with decreased fluoroquinolone susceptibility is different in each endemic regions. In the present study, we attempted to investigate the association of the decrease of fluoroquinolone susceptibility and the mutations in QRDRs of clinical and typical Indonesian Salmonella typhi isolates. All isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer method of disk diffusion using ciprofloxacin. All isolates were examined by PCR and direct nucleotide sequencing for genetic alteration in QRDRs. One ciprofloxacin sensitive isolate were observed with no mutation; ciprofloxacin resistant strains were observed in 2 isolates also with no mutation. The data suggest that QRDRs mutations in this research are not associated with fluoroquinolone resistance in clinical and typical Indonesian Salmonella typhi isolates in this research. Nucleotide re-sequencing is suggested to verify this result.

Key words : Salmonella typhi, QRDRs, fluoroquinolone, susceptibility, mutations

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii

BAB I. PENDAHULUAN

1 Latar Belakang.....	1
2 Identifikasi Masalah.....	3
3 Maksud dan Tujuan.....	3
4 Manfaat Penelitian.....	3
5 Metode Penelitian.....	4
6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	4

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Salmonella typhi</i> (<i>S. typhi</i>)	
2.1.1 Sejarah Penemuan <i>S. typhi</i>	5
2.1.2 Taksonomi dan Karakteristik Mikrobiologi <i>S. typhi</i>	5

Dilarang mempublikasikan atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi KTI tanpa seizin penulis dan pembimbing KTI ini

2.1.2.1	Taksonomi <i>S. typhi</i>	5
2.1.2.2	Karakteristik Mikrobiologi <i>S. typhi</i>	6
2.1.3	Epidemiologi Demam Tifoid.....	7
2.1.4	Perjalanan Klinis Penyakit Infeksi <i>S. typhi</i>	8
2.1.4.1	Demam Tifoid/ <i>Enteric Fever</i>	8
2.1.4.2	<i>Chronic Carrier State</i>	9
2.1.5	Faktor Virulensi <i>S. typhi</i>	9
2.1.6	Patogenesis Demam Tifoid.....	10
2.1.7	Pengobatan, Masalah Resistensi dan Pencegahan Demam Tifoid.....	11
2.1.7.1	Pengobatan dan Masalah Resistensi <i>S. typhi</i>	11
2.1.7.2	Pencegahan Infeksi <i>S. typhi</i>	13
2.1.8	Karakteristik Molekular dan Hubungannya Dengan Resistensi Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	13
2.1.8.1	Karakteristik Molekular <i>S. typhi</i>	13
2.1.8.1.1	DNA <i>Topoisomerase</i>	13
2.1.8.1.2	DNA <i>Gyrase</i>	13
2.1.8.2	Hubungan Karakteristik Molekuler <i>Salmonella Typhi</i> Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	19
2.1.8.2.1	<i>Fluoroquinolone</i>	19
2.1.8.2.2	Berbagai Mutasi pada DNA Topoisomerase Dalam Kaitannya dengan Resistensi Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	21
2.1.8.2.3	Berbagai Penelitian Resistensi	

	<i>Salmonella typhi</i> Terhadap <i>Fluoroquinolone</i> di Beberapa Negara Endemis di Asia.....	22
2.2	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	23
2.3	Elektroforesis.....	26
2.4	Sekuensing DNA.....	28
	2.4.1 Sekuensing dengan Metode Sanger-Coulson/ <i>chain termination</i>	29

BAB III. ALAT, BAHAN DAN METODE

3.1	Subjek Penelitian.....	32
3.2	Metode Penelitian.....	32
3.3	Alat dan Bahan.....	33
	3.3.1 Alat dan Bahan Percobaan Tes Resistensi Sampel Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	33
	3.3.1.1 Alat.....	33
	3.3.2.2 Bahan.....	33
	3.3.2 Alat dan Bahan Percobaan Isolasi DNA.....	33
	3.3.2.1 Alat.....	33
	3.3.2.2 Bahan.....	34
	3.3.3 Alat dan Bahan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan Elektroforesis.....	34
	3.3.3.1 Alat.....	34
	3.3.3.2 Bahan.....	34
3.4	Cara Kerja.....	34

3.4.1 Tes Resistensi Sampel Terhadap <i>Fluoroquinolone</i> Metode Kirby-Bauer <i>Disk Diffusion</i>	34
3.4.2 Pembuatan Templat dengan Isolasi DNA.....	36
3.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis.....	37
3.4.3.1 PCR Menggunakan Primer <i>Ca8</i> dan <i>Ca9</i> Untuk ST7 dan ST11.....	37
3.4.3.2 PCR Menggunakan Primer <i>gyrA-FWD</i> dan <i>gyrA-REV</i>	38
3.4.4 Elektroforesis.....	39
3.4.5 Sekuensing	40
3.4.6 Deteksi Mutasi pada Nukleotida dan Asam Amino DNA Sampel.....	40

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Penanaman Sampel pada Medium <i>Salmonella Shigella</i> Agar..	42
4.2 Pembuatan Kultur Sampel pada Medium <i>Lurient Broth</i>	43
4.3 Tes Resistensi Antibiotik.....	44
4.4 Pembuatan Templat DNA.....	46
4.5 PCR Menggunakan Primer <i>Ca8</i> dan <i>Ca9</i> pada ST7 dan ST22.....	46
4.6 PCR dengan Menggunakan Primer <i>gyrA-FWD</i> dan <i>gyrA-REV</i>	48
4.7 Sekuensing.....	50
4.8 Deteksi Mutasi pada Nukleotida dan Asam Amino DNA Sampel	52
4.8.1 Deteksi Mutasi Nukleotida pada DNA Sampel.....	52
4.8.2 Deteksi Mutasi yang Terekspresi pada Pola Asam Amino DNA Sampel.....	55

4.8.3 Analisis Hasil Deteksi Mutasi DNA Sampel dengan Pola Mutasi <i>Salmonella typhi</i> di Negara Endemis Lainnya.....	57
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	60
5.2 Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	62
RIWAYAT HIDUP.....	65

DAFTAR GAMBAR

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Salmonella typhi</i> pada Pewarnaan Gram.....	7
2.2 Penyebaran <i>Salmonella typhi</i> di Dunia.....	8
2.3 Mekanisme <i>Negative Supercoiling</i> oleh <i>DNA Gyrase</i>	14
2.4 Berbagai Struktur Kimia <i>Fluoroquinolone</i>	20
2.5 Mekanisme Resistensi Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	22
2.6 Berbagai Tahapan PCR.....	26
2.7 Elektroforesis.....	28
2.8 Proses Sekuensing Metode <i>Chain Termination</i>	31

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Sampel *Salmonella typhi* (ST7, ST11, ST22) pada Medium

Dilarang mempublikasikan atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi KTI tanpa seizin penulis dan pembimbing KTI ini

	<i>Salmonella Shigella</i> Agar.....	42
4.2	Hasil Biakan Sampel dan <i>Quality Control</i> Pada <i>Lurient Broth</i>	43
4.3	Hasil Tes Resistensi Sampel Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	44
4.4	<i>Quality Control</i> dan Kontrol Negatif Tes Resistensi.....	44
4.5	Hasil PCR ST7 dan ST11 dengan Primer <i>Ca8</i> dan <i>Ca9</i>	46
4.6	Hasil PCR ST11 dan ST22 dengan Primer <i>gyrA-FWD</i> dan <i>gyrA-REV</i>	48
4.7	Hasil PCR ST7 dengan Primer <i>gyrA-FWD</i> dan <i>gyrA-REV</i> ..	49

DAFTAR TABEL

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Ekspresi Asam Amino Akibat Mutasi Gen <i>gyrA</i> di Berbagai Negara.....	23
-----	--	----

BAB III ALAT, BAHAN DAN METODE

3.1	Identitas Sampel.....	32
3.2	Formula PCR dengan Primer <i>Ca8</i> dan <i>Ca9</i>	38
3.3	Formula PCR dengan Primer <i>gyrA-FWD</i> <i>gyrA-REV</i>	39

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil Tes Resistensi Sampel Metode <i>Disk Diffusion</i>	43
4.2	Tingkat Resistensi Sampel.....	44
4.3	Hasil Uji Validitas Tes Resistensi Sampel	

Dilarang mempublikasikan atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi KTI tanpa seizin penulis dan pembimbing KTI ini

Terhadap <i>Fluoroquinolone</i>	45
4.4 Perbandingan Urutan Nukleotida ST7 dan <i>Salmonella Typhi Strain Ty2</i>	51
4.5 Perbandingan Urutan Nukleotida ST11 dan <i>Salmonella Typhi Strain Ty2</i>	52
4.6 Perbandingan Urutan Nukleotida ST22 dan <i>Salmonella Typhi Strain Ty2</i>	52
4.7 Perbandingan Urutan Asam Amino ST7 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	54
4.8 Perbandingan Urutan Asam Amino ST11 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	54
4.9 Perbandingan Urutan Asam Amino ST22 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	55
4.10 Perbandingan Urutan Asam Amino ST7 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	56
4.11 Perbandingan Urutan Asam Amino ST11 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	56
4.12 Perbandingan Urutan Asam Amino ST22 dan <i>Salmonella typhi Strain Ty2</i>	57

Dilarang mempublikasikan atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi KTI tanpa seizin penulis dan pembimbing KTI ini