

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella adalah bakteri gram negatif berbentuk batang yang terbagi ke dalam berbagai spesies. *Salmonella typhi* merupakan penyebab penyakit *typhoid fever*, yang juga disebut demam tifoid atau demam enterik. *Salmonella typhi* adalah bakteri patogen yang khusus menyerang manusia dan dalam perkembangannya demam tifoid telah menyebabkan banyak kematian di seluruh dunia, terutama pada negara berkembang seperti Indonesia.

Demam tifoid menular melalui makanan dan minuman yang telah tercemar oleh *Salmonella typhi* atau orang yang telah menjadi *carrier*, yaitu orang yang telah mengalami infeksi tetapi bakteri tersebut masih terdapat di dalam tubuhnya. Pada orang yang merupakan *carrier*, biasanya tidak terdapat gejala spesifik, sehingga penularan demam tifoid terutama disebabkan oleh penderita ini.

Antibiotik merupakan faktor penting dalam pengobatan demam tifoid. Beberapa antibiotik lini pertama yang telah ditemukan untuk mengobati demam tifoid adalah kloramfenikol, ampicillin, dan kotrimoxazole. Semakin seringnya penggunaan antibiotik tersebut menyebabkan resistensi dikarenakan adanya mutasi pada bakteri *Salmonella typhi* sehingga bisa bertahan terhadap antibiotik tersebut. Resistensi terhadap tiga agen lini pertama yang telah disebutkan disebut *multi-drug resistance Salmonella typhi* (MDR-ST). Resistensi ini telah menjadi masalah penting di Asia Tenggara dan India selama bertahun-tahun.

Untuk mengatasi masalah resistensi ini, dikembangkan penelitian untuk menemukan obat yang lebih efektif, dan hasilnya ditemukan florokuinolon yang efektif untuk mengatasi MDR-ST. Florokuinolon saat ini digunakan sebagai obat lini pertama untuk pengobatan demam tifoid, namun pada perkembangannya terdapat laporan yang menyatakan bahwa sensitivitas bakteri *Salmonella typhi* terhadap

florokuinolon mulai menurun (Chau *et al.*, 2007). Oleh karenanya perlu ada pengembangan obat baru yang dapat menanggulangi resistensi ini agar pengobatan demam tifoid lebih efektif.

Seiring perkembangan pengetahuan dan teknologi dalam bidang rekombinan DNA, diketahui bahwa *Salmonella typhi* memiliki beberapa faktor virulensi yang menyebabkan infeksi pada manusia, salah satunya adalah PhoP-PhoQ *two component regulatory system*. PhoP-PhoQ *two component regulatory system* ini merupakan salah satu target potensial yang dapat digunakan untuk pengembangan obat baru sehingga terapi demam tifoid menjadi lebih efektif. PhoP-PhoQ *two component regulatory system* termasuk ke dalam *two component signal transduction system* (TCS) dari bakteri. TCS adalah sistem yang memiliki dua komponen, yaitu sensor protein yang berada di membran sel, dan respon regulator protein. (Mascher *et al.*, 2006). Sensor protein atau histidin kinase, dalam hal ini PhoQ, bertugas untuk menerima sinyal transduksi berupa perubahan yang terjadi pada lingkungan, yang kemudian akan melakukan autofosforilasi kemudian mentransfer gugus fosfat kepada respon regulator yaitu PhoP, dan PhoP yang telah terfosforilasi akan mengaktifasi dan merepresi kurang lebih 40 lokus gen (Groisman, 2001). Gen-gen yang teraktivasi atau terepresi oleh aktivitas TCS pada akhirnya akan menyebabkan *Salmonella typhi* dapat bertahan terhadap berbagai kondisi yang seharusnya mematikan bagi bakteri tersebut. Berdasarkan alasan inilah, maka PhoP-PhoQ *two component regulatory system* dianggap salah satu target potensial untuk pengembangan antibiotik yang baru. Selain itu, terdapat beberapa hal lain yang menyebabkan TCS menjadi target potensial untuk antimikroba, yaitu: terdapat homologi antara histidin kinase dan respon regulator pada beberapa spesies bakteri serta bakteri patogen menggunakan transduksi sinyal TCS untuk meregulasi ekspresi faktor virulensi esensial yang dibutuhkan untuk hidup di dalam sel inang.

Untuk mencari antibiotik baru yang menyerang sistem PhoP-PhoQ, dibutuhkan satu sistem *screening* terhadap antibiotik yang akan dikembangkan (*high-throughput genetic system*). Sistem *screening* ini bertargetkan dimerisasi PhoQ sebagai histidine

kinase. Sistem *screening* yang akan dikembangkan bertujuan untuk mengetahui apakah antibiotik yang baru memiliki kemampuan untuk menyerang sistem PhoP-PhoQ yang dapat diketahui melalui ekspresi gen *Green Fluorescence Protein* (GFP).

Pada penelitian ini, dilakukan penelitian awal untuk mengetahui kondisi optimal untuk mengisolasi dan mengkloning *phoQ* dari *Salmonella typhi*. Pada kelanjutannya, hasil amplifikasi *phoQ* akan menjadi bagian dari sistem *screening* setelah sebelumnya dikombinasikan dengan gen represor dari *E. coli* serta gen promoter represor dan gen reporter berupa GFP.

1.2 Identifikasi Masalah

Bagaimana kondisi PCR yang optimal untuk mengamplifikasi gen *phoQ* dari *Salmonella typhi*, dan proses untuk melakukan kloning gen *phoQ*.

1.3 Maksud dan Tujuan

Maksud penelitian adalah untuk mendapatkan sistem *screening* dengan menggunakan *phoQ* sebagai salah satu komponennya sebagai identifikasi apakah antibiotik yang baru memiliki kemampuan menyerang sistem PhoPQ sebagai targetnya.

Tujuan penelitian adalah untuk melakukan isolasi, optimasi amplifikasi, serta kloning dari gen *phoQ*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat akademik

Penelitian ini dimaksudkan sebagai penelitian pendahuluan untuk mengembangkan sistem *screening* terhadap antibiotik baru yang mempunyai target

sistem PhoPQ yang pada proses selanjutnya dapat menanggulangi masalah resistensi bakteri *Salmonella typhi* terhadap antibiotik yang ada.

1.4.2 Manfaat praktis

Untuk mempermudah pencarian antibiotik baru terhadap *Salmonella typhi* yang memiliki target sistem transduksi pada *two component system*.

1.5 Metodologi Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratorium. Isolasi kromosom *Salmonella typhi* dilakukan dengan menggunakan *Wizard Isolation Kit*. DNA yang telah diisolasi ini akan menjadi templat untuk melakukan amplifikasi gen PhoQ yang merupakan sensor kinase dalam PhoP-PhoQ *two component system*. Setelah itu, hasil PCR dipurifikasi dan diligasikan ke vektor pGEM-T easy. Hasil DNA rekombinan akan diaplikasikan untuk merubah sifat dari *E. coli* DH5 .

Transformasi sifat dari *E. coli* dapat diketahui dengan identifikasi koloni berwarna biru dan putih pada penanaman *E. coli* tersebut di medium X-gal dengan ampicillin dan IPTG. Hasil kloning yang positif ditandai dengan koloni putih yang dapat tumbuh pada medium dengan ampicillin. Setelah itu, hasil kultur dianalisis menggunakan metode lisis cepat yang hasilnya dilihat menggunakan elektroforesis gel agarosa.

1.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Pengembangan Ilmu Kedokteran (PPIK) Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung dan Laboratorium Bioteknologi Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung (ITB).

Penelitian berlangsung mulai bulan Februari 2008 sampai Desember 2008.