

**Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik pada
Isolat Indigenus *Salmonella typhi***

Skripsi



Vincent Santosa

31190293

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2023

**Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik pada
Isolat Indigenus *Salmonella typhi***

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si.)
Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana

Vincent Santosa

31190293

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi**

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2023

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vincent Santosa
NIM : 31190293
Program studi : Biologi
Fakultas : Bioteknologi
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“JUDUL SKRIPSI/TESIS/DISERTASI”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta
Pada Tanggal : 02 Juli 2023

Yang menyatakan


Vincent Santosa
NIM: 31190293

Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

DETEKSI GEN *INVA* DAN UJI RESISTENSI ANTIBIOTIK PADA ISOLAT
INDIGENUS *SALMONELLA TYPHI*

telah diajukan dan dipertahankan oleh:

VINCENT SANTOSA

31190293

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

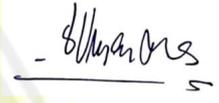
dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Sarjana Sains pada tanggal 15 Juni 2023

Nama Dosen

Tanda Tangan

1. Dr. Charis Amarantini, M.Si.
(Dosen Pembimbing I/ Ketua Tim Penguji)
2. Tri Yahya Budiarmo, S.Si., M.P.
(Dosen Pembimbing II/ Tim Penguji)
3. Dr. Dhira Satwika, M.Sc.
(Tim Penguji)



Yogyakarta, 15 Juni 2023

Disahkan Oleh:

Dekan,

Ketua Program Studi,



Dr. Dhira Satwika, M.Sc.



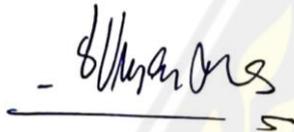
Dwi Adityarini, S.Si., M.Biotech.

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik
pada Isolat Indigenus *Salmonella typhi*
Nama Mahasiswa : Vincent Santosa
Nomor Induk Mahasiswa : 31190293
Hari/Tanggal Ujian : Kamis, 15 Juni 2023

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. Charis Amaranitini, M.Si.

NIK: 914E155

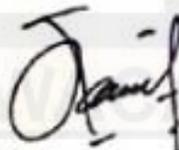
Pembimbing Pendamping,



Tri Yahya Budiarmo, S.Si., M.P.

NIK: 934E209

Ketua Program Studi,



Dwi Adityarini, S.Si., M.Biotech.

NIK: 214E556

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vincent Santosa

NIM : 31190293

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik pada Isolat Indigenus *Salmonella typhi*”

adalah hasil karya penulis dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan penulis juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan penulis bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 01 Juni 2023



Vincent Santosa

NIM: 31190293

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan anugerahnya sehingga penulisan skripsi dengan judul “**Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik pada Isolat Indigenus *Salmonella typhi***” dapat berjalan dengan lancar dan dapat digunakan sebagai salah satu syarat untuk dapat memperoleh gelar Sarjana Sains pada Universitas Kristen Duta Wacana.

Selama proses penelitian di laboratorium dan penulisan naskah skripsi ini, tentu saja peneliti mengalami banyak hambatan dan kendala. Namun, berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan waktu yang diharapkan. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya terutama kepada:

1. Orang tua dan adik penulis; **Andy Santosa** dan **Shieny Indrawati Apriyatna** serta **Verrel Santosa** yang selalu memberikan *support* kepada penulis setiap harinya agar penulis tetap bersemangat dalam meneliti dan juga setia menunggu selama 4 tahun hingga penulis mendapatkan gelar Sarjana Sains.
2. Ibu **Dr. Charis Amarantini, M.Si.**, selaku dosen pembimbing penulis yang telah memberikan nasihat dan bimbingannya yang tidak dapat diukur dengan apapun.
3. Bapak **Tri Yahya Budiarso, S.Si., M.P.**, selaku dosen pembimbing kedua penulis yang bersama dengan Bu Charis sudah memberikan informasi kepada penulis mengenai hal-hal yang dibutuhkan dalam penelitian.
4. Bapak **Dr. Dhira Satwika, M.Sc.**, selaku dosen wali studi penulis.
5. Kak **Dewi Andini**, selaku laboran penulis yang selalu sabar dalam menghadapi penulis terutama ketika melakukan penelitian molekuler.
6. **Brenden Angellie**, selaku sahabat yang sudah penulis anggap sebagai adik sendiri.

7. **Jidan, Yudi, Enji, Titi, Enjelina, Rama, Otnil**; yang setiap hari menemani penulis ketika penelitian maupun penulisan naskah skripsi di Gedung Makarios.
8. **Depi, Sarpir, Dwiki, Kia, Reka, Wahyu**; selaku sahabat-sahabat penulis baik di luar maupun di dalam laboratorium.
9. Orang-orang berjasa lainnya yang tidak dapat disebutkan namanya.
10. *Last but not least*, **Cantiara Sesa**; sebagai *support system* selama 5 bulan terakhir ini dari awal penelitian hingga akhir penulisan skripsi yang setia dalam mendengarkan *ups and downs* penulis.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari bahwa masih terdapat beberapa kekurangan di dalamnya, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca. Akhir kata, semoga skripsi yang dibuat oleh tawa dan tangis ini dapat memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya, baik dijadikan sebagai referensi maupun inspirasi perjalanan hidup yang terus berjala

Yogyakarta, 01 Juni 2023



Vincent Santosa

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| HALAMAN SAMPUL..... | i |
| LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI | iii |
| LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN | iv |
| KATA PENGANTAR..... | v |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR TABEL..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR..... | x |
| ABSTRAK | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| BAB I..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 2 |
| BAB II | 3 |
| 2.1 Karakteristik <i>S. typhi</i> dan Faktor Risiko | 3 |
| 2.2 Gen <i>InvA</i> | 4 |
| 2.3 Antibiotik, Resistensi, dan Golongan Antibiotik | 5 |
| 2.4 Isolasi DNA, PCR, Elektroforesis, <i>GelDoc</i> | 9 |
| 2.5 Uji Kepekaan Antibiotik | 11 |
| BAB III..... | 13 |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 13 |
| 3.1.1 Tempat | 13 |
| 3.1.2 Waktu..... | 13 |
| 3.2 Bahan | 13 |
| 3.3 Alat..... | 13 |
| 3.4 Cara Kerja | 13 |
| 3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan | 13 |
| 3.4.2 Penumbuhan Kembali Bakteri | 14 |
| 3.4.3 Uji Sensitivitas..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 3.4.4 Uji Keberadaan Gen <i>invA</i> | 15 |
| BAB IV | 18 |
| 4.1 Pemeriksaan Kemurnian Kultur | 18 |
| 4.2 Profil Resistensi <i>S. typhi</i> terhadap Antibiotik | 20 |
| 4.3 Deteksi Gen <i>invA</i> | 26 |
| BAB V | 30 |
| 5.1 Kesimpulan | 30 |
| 5.2 Saran | 30 |
| DAFTAR PUSTAKA | 31 |
| LAMPIRAN | 36 |



DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 3. 1 Kondisi PCR <i>Salmonella typhi</i> | 17 |
| Tabel 4. 1 Hasil uji resistensi isolat <i>S. typhi</i> terhadap antibiotik | 23 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|--------------------|---|----|
| Gambar 4. 1 | Pertumbuhan isolat <i>S. typhi</i> pada media BHI cair..... | 18 |
| Gambar 4. 2 | Kenampakan morfologis sel <i>S. typhi</i> hasil pewarnaan gram..... | 19 |
| Gambar 4. 3 | Zona hambat isolat <i>S. typhi</i> terhadap antibiotik | 21 |
| Gambar 4. 4 | Profil resistensi <i>S. typhi</i> terhadap antibiotik..... | 26 |
| Gambar 4. 5 | Hasil elektroforesis isolasi DNA isolat <i>S. typhi</i> | 27 |
| Gambar 4. 6 | Amplikon gen <i>invA</i> hasil elektroforesis..... | 28 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1: Stok Salmonella typhi dalam gliserol..... | 36 |
| Lampiran 2: Marker DNA 1000bp..... | 36 |
| Lampiran 3: Protokol Promega PCR Master Mix | 37 |
| Lampiran 4: Protokol isolasi DNA Geneaid Presto Mini gDNA Bacteria Kit ... | 38 |
| Lampiran 5: Hasil uji resistensi isolat BPE 7.10 MC | 40 |
| Lampiran 6: Hasil uji resistensi isolat RSL 3.1 SSA | 40 |
| Lampiran 7: Hasil uji resistensi isolat BPE 123.1 CCA | 40 |
| Lampiran 8: Hasil streak plate isolat <i>S. typhi</i> NCTC 786..... | 41 |
| Lampiran 9: Kondisi PCR yang digunakan | 41 |
| Lampiran 10: Lembar konsultasi | 42 |



ABSTRAK

Deteksi Gen *InvA* dan Uji Resistensi Antibiotik pada Isolat Indigenus *Salmonella typhi*

VINCENT SANTOSA

31190293

Salmonella typhi merupakan bakteri gram-negatif yang patogenik penyebab penyakit demam tifoid. Salah satu cara untuk mengatasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah dengan menggunakan antibiotik. Saat ini, ada banyak antibiotik yang dapat dijumpai di pasaran. Namun, karena pola penggunaan antibiotik yang repetitif, bakteri patogen menjadi resisten terhadap antibiotik tersebut. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat seberapa besar efektivitas suatu antibiotik untuk mengatasi masalah yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi* dan juga untuk mendeteksi ada atau tidaknya gen *invA* dalam isolat yang diuji sebagai penanda isolat tersebut bersifat patogenik. Pada penelitian ini dilakukan uji kepekaan 10 jenis antibiotik pada isolat *S. typhi* menggunakan metode *disc diffusion* (Kirby-Bauer method). Profil resistensi dikategorikan berdasarkan zona hambat yang terbentuk dengan mengacu pada standar yang dikeluarkan oleh Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Antibiotik *imipenem* dan *piperacillin* merupakan antibiotik yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan karena memiliki zona hambat terbesar. Keberadaan gen *invA* dengan ukuran 284 pasangan basa ditemukan pada semua isolat setelah melakukan rangkaian isolasi DNA, PCR dan elektroforesis yang menandakan bahwa semua isolat bersifat patogenik.

Kata kunci: *Salmonella typhi*, antibiotik, *invA*, resistensi antibiotik

ABSTRACT

***InvA* Gene Detection and Antibiotic Resistance Test on Indigenous *Salmonella typhi* Isolates**

VINCENT SANTOSA

31190293

Salmonella typhi is a gram-negative bacterium that is pathogenic and causes *tifoid* fever. One way to treat diseases caused by bacteria is to use antibiotics. Currently, there are many antibiotics that can be found in the market. However, due to the repetitive pattern of use of antibiotics, pathogenic bacteria become resistant to these antibiotics. This study was conducted with the aim of seeing how effective an antibiotic is in overcoming problems caused by *S. typhi* bacteria and also to detect the presence or absence of the *invA* gene in the tested isolates as a marker of pathogenic isolates. In this study, a sensitivity test of 10 types of antibiotics was carried out on *S. typhi* isolates using the disc diffusion method (Kirby-Bauer method). The resistance profile is categorized based on the inhibition zone formed with reference to the standards issued by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Imipenem and piperacillin antibiotics are the most effective antibiotics for inhibiting growth because they have the largest inhibition zone. The presence of the *invA* gene with a size of 284 base pairs was found in all isolates after carrying out a series of DNA isolation, PCR and electrophoresis which indicated that all isolates were pathogenic.

Key words: *Salmonella typhi*, antibiotic, *invA*, antibiotic resistance

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ada banyak sekali jajanan berupa produk pangan yang dapat ditemukan di masyarakat. Proses pembuatan jajanan-jajanan ini kerap kali kurang memerhatikan sanitasi terutama pada jajanan yang dijual di kaki lima. Kurangnya sanitasi dalam proses pembuatan jajanan ini dapat mengakibatkan masalah serius bagi kesehatan manusia karena meningkatkan potensi pencemaran oleh bakteri patogen yang berbahaya seperti *Salmonella typhi* sebagai penyebab penyakit demam tifoid. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan untuk mengobati penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri. Pengobatan yang sesuai untuk melawan penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen antara lain adalah pengobatan menggunakan antibiotik. Namun, karena adanya peningkatan penggunaan antibiotik di masa kini, kasus resistensi antibiotik juga meningkat. Menurut data, dari tahun ke tahunnya kasus resistensi antibiotik selalu mengalami peningkatan dalam grafik.

Antibiotik merupakan suatu zat kimia yang berasal dari makhluk hidup dan berfungsi untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dalam tubuh khususnya bakteri. Ada beragam jenis antibiotik yang dapat ditemukan seperti kelas *penicillin*, *tetracycline*, *aminoglycoside*, dan lain sebagainya. Setiap jenis antibiotik ini memiliki target bakteri masing-masing. Untuk mengetahui antibiotik apa yang sesuai untuk membunuh bakteri *S. typhi*, diperlukan uji kepekaan bakteri terhadap antibiotik yang bertujuan untuk mengetahui efektivitas suatu antibiotik untuk mengatasi penyakit-penyakit tersebut. Untuk menetapkan bahwa *S. typhi* itu merupakan bakteri patogen yang berbahaya bagi manusia, perlu dilakukan uji deteksi keberadaan gen *invA* yang terdapat pada materi genetik pembentuk *S. typhi*. Gen *invA* adalah gen yang ada dan spesifik ditemukan pada bakteri patogen khususnya genus *Salmonella*. Gen ini mengandung sekuens DNA yang unik dan umumnya digunakan untuk melakukan identifikasi pada saat proses PCR dilakukan. Untuk mendeteksi keberadaan gen ini, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan seperti isolasi DNA, dilanjutkan dengan

PCR, dan diakhiri oleh pembacaan di *GelDoc* setelah melalui tahapan elektroforesis.

Pada penelitian kali ini, digunakan isolat indigenus *S. typhi* yang didapatkan dan dikoleksi dari penelitian yang dilakukan oleh Amarantini dkk. (2011). Isolat tersebut diambil dari darah pasien terinfeksi di Rumah Sakit Karitas, Sumba Barat. Alasan penggunaan isolat tersebut adalah karena isolat *S. typhi* ini belum dideteksi sifat resistensinya terhadap antibiotik selain *Nalicylic Acid*. Maka dari itu, perlu dilakukan uji kepekaan isolat tersebut menggunakan antibiotik jenis lain untuk mendapatkan informasi tambahan mengenai pola kepekaannya terhadap antibiotik. Selain uji kepekaan, perlu juga dilakukan deteksi keberadaan gen *invA* karena isolat ini belum dipastikan sifat patogeniknya yang dapat dilihat dari ada atau tidaknya faktor virulensi dalam isolat ini.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah isolat *S. typhi* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki faktor virulensi (gen *invA*) sebagai faktor patogen?
2. Bagaimana profil kepekaan isolat *S. typhi* terhadap antibiotik?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ada tidaknya gen *invA* sebagai faktor virulensi pada isolat *S. typhi*
2. Mengetahui profil resistensi antibiotik dari isolat *S. typhi* yang dikoleksi dari darah pasien penderita di Rumah Sakit Karitas, Sumba Barat pada tahun 2011.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan wawasan pengetahuan dan informasi yang berguna bagi masyarakat terkait karakter dari bakteri *S. typhi*.
2. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi bahan evaluasi atas penggunaan antibiotik yang sudah digunakan saat ini.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik *S. typhi* dan Faktor Risiko

Ada banyak jenis bakteri yang ditemukan di dunia ini. Secara garis besar, bakteri yang ditemukan di dunia ini dibagi menjadi dua yakni bakteri gram-positif dan bakteri gram-negatif. Perbedaan mendasar kedua jenis ini adalah pada ketebalan peptidoglikannya. Bakteri gram-positif memiliki peptidoglikan yang lebih tebal ketimbang bakteri gram-negatif. *Salmonella enterica* serovar Typhi merupakan bakteri berjenis gram-negatif dan memiliki ciri khusus yakni berbentuk basil, bergerak menggunakan flagella, dan tidak memiliki spora pada strukturnya (Keyser *et al.*, 2018). Hingga kini, nomenklatur bakteri ini masih mengalami banyak perdebatan karena kriteria yang rancu untuk menunjuk bakteri ini sebagai spesies. Seiring berjalannya waktu dan setelah melalui berbagai penelitian yang ditinjau dari hubungan filogenetik serta tinjauan taksonomi, diputuskanlah bahwa nama yang benar adalah nama yang tertulis dalam *Approved Lists of Bacterial Names* yaitu *Salmonella typhi* (Skerman *et al.*, 1980). *Salmonella typhi* merupakan bakteri yang sudah dikenal oleh masyarakat umum karena bakteri ini merupakan salah satu bakteri yang paling sering menyebabkan penyakit pada manusia terutama yang berhubungan dengan masalah pencernaan. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini disebut juga sebagai salmonellosis. Bakteri ini merupakan bakteri yang sering dijumpai di makanan seperti telur ayam, daging mentah, sayuran segar seperti sawi, maupun pada air yang tercemar (Apriani *et al.*, 2019). Bakteri genus *Salmonella* memiliki 5 spesies utama yaitu *Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, dan *Salmonella typhimurium* (Brenner *et al.*, 2000). Bakteri *S. typhi* dibedakan menjadi 2 kelompok besar yaitu spesies tifoidal dan non-tifoidal. Spesies tifoidal adalah spesies yang dapat menyebabkan demam tifoid sedangkan spesies non-tifoidal adalah spesies yang dapat menyebabkan penyakit lain selain demam tifoid seperti diare dan enterolitis (Kuswiyanto, 2017). Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini dapat mengakibatkan terjadinya kematian apabila tidak ditangani secara tepat (Umair, *et al.*, 2020). Beberapa langkah yang penting untuk mengendalikan dampak dan

penyebaran dari penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini adalah dengan meningkatkan akses ke air minum steril, meningkatkan sanitasi, dan memilih bahan pangan yang sudah terolah dengan baik (Marchello *et al.*, 2020).

Bakteri *S. typhi* menginfeksi tubuh manusia melalui makanan tercemar yang dikonsumsi lalu bakteri ini akan menginvasi yang terdapat di usus dan menghasilkan senyawa toksik yang bersifat patogen. Selain makanan yang dikonsumsi, penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini juga dapat dibawa oleh hewan vektor, salah satunya adalah lalat. Hewan vektor akan membawa secara pasif bakteri yang berasal dari muntahan, urin, dan kotoran dari orang yang terinfeksi *S. typhi*. Bakteri yang terbawa oleh vektor akan mencemari makanan lain yang akhirnya akan dikonsumsi juga oleh manusia. Saat bakteri masuk ke dalam saluran cerna, bakteri yang tidak mati oleh asam lambung kemudian masuk ke dalam ileum distal aktif sehingga akan menyebabkan terjadinya perforasi usus halus. Bakteri yang berada di ileum distal aktif ini akan menuju ke tempat selanjutnya yaitu kelenjar getah bening, pembuluh darah, dan seluruh tubuh (Veteriner *et al.*, 2017).

Saat ini, data epidemiologi penyebaran infeksi bakteri *S. typhi* di berbagai produk pangan yang tersebar di Indonesia tercatat sudah mencapai 46,6%. Selain ditemukan di berbagai produk mentah, bakteri ini juga ditemukan di produk olahan matang seperti ayam bakar, ayam goreng, maupun daging ayam suwir pada bubur. Tercatat, kasus kejadian salmonellosis di dunia per tahunnya mencapai angka 93,8 juta kasus. Angka ini bukanlah angka yang sedikit sehingga keberadaannya dapat dikategorikan sebagai ancaman dengan risiko tinggi yang dapat mengancam kesehatan masyarakat. Kelompok usia yang paling memiliki risiko tinggi terkena infeksi bakteri *S. typhi* adalah ibu hamil, bayi, dan juga lansia (Zelpina, 2020).

2.2 Gen *InvA*

Sama halnya dengan makhluk hidup lain, salah satu komponen penyusun bakteri adalah materi genetik yang berupa rantai DNA maupun RNA. Materi genetik atau yang biasa disingkat sebagai gen ini memiliki fungsi untuk mewariskan sifat dari satu generasi ke generasi selanjutnya sehingga ada sifat yang

dipertahankan dari leluhurnya. Sifat/informasi genetik ini disimpan dalam urutan empat basa yaitu adenin, timin, guanin, dan sitokinin yang berada dalam asam nukleat (Baktir, 2017). Ada banyak gen yang ditemukan dalam suatu bakteri, salah satunya adalah gen penanda *invA*. Gen *invA* adalah suatu gen penanda spesifik yang terdapat dalam bakteri *S. typhi*. Gen ini memiliki suatu ciri yang membuatnya dapat dijadikan gen target untuk identifikasi *S. typhi* yaitu laju mutasi yang rendah. Gen *invA* pada bakteri *S. typhi* terletak pada suatu daerah yang dinamakan dengan *Salmonella Pathogenicity Island* (SPI). SPI adalah suatu daerah yang memiliki banyak kluster gen invasif yang menyebabkan bakteri tersebut patogenik (Marcus *et al.*, 2020). SPI dalam *S. typhi* terbagi menjadi 5 jenis yaitu SPI 1-5 dengan perbedaan pada mekanisme kerjanya masing-masing. Untuk gen *invA* sendiri, terletak pada SPI-1 yang memiliki mekanisme menginvasi sel epitelium sehingga akan menyebabkan reaksi inflamasi pada usus (Lou *et al.*, 2019). Maka dari itu, gen ini dapat digunakan untuk menentukan apakah bakteri tersebut patogen atau tidak (Yanestria *et al.*, 2019). Gen *invA* pada umumnya memiliki ukuran molekuler sebesar 284 pasangan basa (Rahn, *et al.*, 1992). Letak *invA* pada bakteri *Salmonella* berada pada kromosom penghasil protein yang dapat memberikan sifat invasif untuk menginvasi sel epitel dalam usus (Muhsinin *et al.*, 2018). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Karmi (2013), tercatat bahwa *S. typhi* yang memiliki gen *invA* bersifat lebih invasif ketimbang *S. typhi* yang tidak memiliki gen tersebut. Maka dari itu, dapat disimpulkan bahwa gen *invA* ini merupakan faktor virulensi yang penting bagi *S. typhi*. (Liwan, *et al.*, 2018). Untuk mendeteksi *S. typhi* menggunakan primer gen *invA*, cara yang paling umum dilakukan adalah melakukan isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan diakhiri dengan pembacaan di *GelDoc*.

2.3 Antibiotik, Resistensi, dan Golongan Antibiotik

Salah satu cara mengatasi penyakit yang diinfeksi oleh bakteri adalah dengan penggunaan antibiotik. Antibiotik sendiri memiliki definisi sebagai zat-zat kimia yang berasal dari makhluk hidup khususnya bakteri yang berfungsi untuk mematikan ataupun menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen. Walaupun memiliki fungsi yang bersifat destruktif, namun toksisitas antibiotik

terhadap manusia dapat dikatakan relatif kecil. Antibiotik tercatat memiliki dua efek utama. Efek pertama dari antibiotik adalah sebagai obat yang dapat menyerang organisme infeksius dan juga mengeliminasi bakteri lain yang bukan penyebab penyakit. Efek kedua dari antibiotik adalah dapat menyebabkan perubahan ekosistem antara strain yang peka dan yang resisten sehingga akan terjadinya gangguan ekologi mikrobial alami. Gangguan ekologi mikrobial ini menyebabkan adanya varian bakteri baru dan juga varian bakteri resisten dari bakteri yang sudah ada. Antibiotik dalam penggunaannya tidak boleh diberikan secara asal-asalan karena akan menimbulkan efek-efek negatif. Beberapa efek negatif yang ditimbulkan akibat konsumsi antibiotik yang tidak wajar adalah terjadinya resistensi mikroorganisme, meningkatnya efek samping obat, dan bahkan dapat mengakibatkan kematian. Penggunaan antibiotik dikatakan tepat apabila efek terapi sudah mencapai titik maksimal dengan diikutinya efek toksik yang berkaitan dengan obat menjadi minimum. Selain itu, penggunaan antibiotik juga dikatakan sudah tepat apabila perkembangan antibiotik membuat kehadiran mikroorganisme resisten seminimal mungkin (Pratiwi, 2017).

Salah satu dampak negatif penggunaan antibiotik adalah terjadinya resistensi antibiotik. Resistensi terjadi pada saat bakteri patogen mengalami kekebalan dalam merespon antibiotik yang awalnya bersifat sensitif dalam pengobatan yang mengakibatkan bakteri menjadi tidak dapat dibunuh maupun dihambat pertumbuhannya oleh suatu antibiotik sehingga perlu melakukan kombinasi antibiotik ataupun melakukan pengobatan dengan cara lain. Terjadinya resistensi antibiotik dikarenakan banyaknya kasus infeksi yang ditemukan di seluruh dunia dengan pengobatan yang tidak berinovasi dan repetitif (Nair *et al.*, 2018). Tidak hanya berdampak pada sistem dalam tubuh, namun resistensi juga mengakibatkan biaya pengobatan yang lebih tinggi bagi pasien karena pasien akan lebih lama tinggal di rumah sakit. Selain itu, resistensi juga dapat meningkatkan angka kematian bagi penderitanya (Mariana *et al.*, 2021).

Antibiotik sendiri memiliki mekanisme/prinsip kerja dalam tujuannya untuk mematikan atau menghambat mikroorganisme patogen yang berada dalam tubuh.

Dalam kasus infeksi, penggunaan antibiotik melibatkan 3 aspek yang saling berkaitan. Aspek-aspek tersebut adalah antibiotik, mikroorganisme, dan inang. Prinsip kerja antibiotik berbeda dengan prinsip kerja obat lain pada umumnya. Apabila prinsip penggunaan obat lain menargetkan sel inang, prinsip kerja antibiotik adalah menargetkan pada sel kuman/mikroorganisme patogennya. Dalam penggunaannya, antibiotik diharapkan mampu mencapai target infeksi dengan kadar yang cukup dalam artian melebihi kadar hambat minimum (KHM). Setelah mencapai target infeksi, antibiotik akan melakukan penetrasi ke dalam sel bakteri dan akan mengganggu proses metabolisme bakteri patogen tersebut sehingga bakteri akan menjadi tidak aktif atau mati. Namun, dalam hal ini, perlu dicatat bahwa efek toksik yang dihasilkan harapannya dapat seminimal mungkin dampaknya pada sel inang (Amin, 2014).

Menurut Amin (2014), ada beragam jenis kelas antibiotik yang dijumpai di dunia ini. Antibiotik-antibiotik tersebut tentunya memiliki cara kerja yang berbeda-beda dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Beberapa contoh cara kerja yang dilakukan antibiotik untuk menghambat/membunuh bakteri adalah menghambat sintesis dinding sel bakteri dan merusak membran sel mikroorganisme (*penicillin, cephalosporin, carbapenem*), menghambat sintesis protein mikroorganisme dengan mengganggu subunit ribosom 30S dan 50S (*aminoglycoside, tetracyclines, chloramphenicol*), dan juga menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba (*quinolone*).

Dari banyaknya ragam antibiotik, setidaknya ada 8 kelas antibiotik yang paling umum dijumpai dan sudah banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. 8 kelas tersebut adalah *aminoglycoside, cephalosporins, penicillin, tetracyclines, quinolones, macrolide, glycopeptides*, dan *carbapenem*. *Aminoglycoside* mampu menghambat/membunuh bakteri gram-negatif. Antibiotik ini memiliki mekanisme mematikan bakteri dengan cara menghambat sintesis protein melalui interaksi dengan subunit ribosom 30S. Contoh dari antibiotik ini adalah *gentamicin*. Kelas yang kedua adalah *cephalosporin*. Kelas ini mampu menghambat/membunuh bakteri baik gram-negatif maupun gram-positif. Contoh

dari kelas antibiotik ini adalah *ceftazidime*. Mekanisme pengobatan yang dilakukan antibiotik ini adalah dengan cara menghambat sintesis dinding sel. Selanjutnya adalah *penicillin*. Antibiotik ini sudah sangat umum dijumpai bahkan di apotik-apotik terdekat. Target dari penggunaan antibiotik ini adalah bakteri gram-negatif dan gram-positif. Mekanisme dari antibiotik ini adalah hampir mirip dengan *cephalosporin* yaitu menghambat terjadinya sintesis asam amino *d-alanyl-d-alanine* pada dinding sel. *Ampicillin* merupakan salah satu contoh jenis antibiotik yang tergolong dalam penicillin.

Kelas antibiotik yang keempat adalah *tetracycline*. *Tetracycline* dapat membunuh/menghambat pertumbuhan bakteri berjenis gram-positif dan gram-negatif. Contoh dari antibiotik ini adalah doxocycline. Cara kerja dari antibiotik ini adalah dengan cara menghambat sintesis protein dengan mengganggu ribosom 30S. Antibiotik yang kelima adalah *quinolone*. *Quinolone* dapat membunuh kedua jenis bakteri baik gram-positif maupun gram-negatif. *Ciprofloxacin* merupakan salah satu jenis antibiotik golongan *quinolones*. Pada antibiotik ini, kinerjanya adalah dengan cara menghambat replikasi DNA pada bakteri dan menghambat sintesis asam nukleat. Selanjutnya, antibiotik yang keenam adalah *macrolide*. Berbeda dengan yang sebelum-sebelumnya, antibiotik ini hanya mampu menghambat/membunuh bakteri gram-positif. Mekanisme kerja dari antibiotik kali ini adalah menghambat terjadinya sintesis protein namun bukan dengan mengganggu ribosom 30S melainkan 50S. Contoh dari antibiotik ini adalah *erythromycin*. Antibiotik umum selanjutnya adalah *glycopeptides* yang hanya dapat membunuh/menghambat bakteri gram positif. Contoh dari jenis antibiotik ini adalah *vancomycin*. Mekanisme antibiotik golongan ini mirip dengan antibiotik golongan *cephalosporin* yaitu menghambat sintesis dinding sel. Antibiotik yang terakhir adalah antibiotik *carbapenem*. Antibiotik ini menyerang baik bakteri gram-positif maupun gram-negatif. Mekanisme antibiotik ini adalah menghambat terjadinya sintesis dinding sel. Contoh antibiotik yang termasuk ke dalam kelas ini adalah *imipenem* dan juga *meropenem* (Pradipta *et al.*, 2012).

Pada penelitian kali ini, digunakan 6 kelas antibiotik yaitu *penicillin*, *cephalosporin*, *carbapenem*, *aminoglycoside*, *tetracycline*, dan juga *quinolone*. Keenam kelas antibiotik tersebut dibagi menjadi 3 kelompok sesuai dengan mekanisme kerjanya. Kelompok pertama adalah kelompok yang menghambat terjadinya sintesis pada dinding sel. Kelas yang masuk dalam kelompok tersebut adalah *penicillin*, *cephalosporin*, dan *carbapenem*. Kelompok selanjutnya adalah kelompok yang menghambat terjadinya sintesis protein. *Aminoglycoside* dan *tetracycline* adalah kelas yang masuk ke dalam kelompok ini. Kelompok yang terakhir adalah kelompok yang menghambat sintesis asam nukleat. Satu-satunya kelas yang masuk ke dalam kelompok ini adalah *quinolone*. Alasan pemilihan antibiotik tersebut adalah karena pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya dengan menggunakan antibiotik yang sama, masih terdapat kerancuan pada hasil. Kerancuan yang dimaksud adalah adanya perbedaan hasil antara isolat dengan perlakuan yang sama. Selain itu, kelas antibiotik yang digunakan pada penelitian ini tidak sulit untuk ditemukan (Marchello, *et al.*, 2020).

2.4 Isolasi DNA, PCR, Elektroforesis, GelDoc

Untuk mendeteksi materi gen yang terdapat dalam bakteri, perlu digunakan beberapa tahapan yang tepat. Umumnya, dari isolat sampel bakteri yang belum diberi perlakuan apa-apa, dilakukan beberapa tahapan yakni isolasi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan juga elektroforesis. Kemudian, hasil yang nampak pada tahapan elektroforesis divisualisasikan menggunakan *GelDoc*. Isolasi DNA merupakan tahapan yang memiliki tujuan untuk mendapatkan DNA murni yang akan dipakai pada tahapan selanjutnya. Ada beberapa tahapan yang terjadi pada saat melakukan isolasi DNA, yaitu: (1) Pemecahan dinding dan membran sel; (2) Ekstraksi/pemisahan DNA dari bahan padat; dan (3) Pemurnian/purifikasi DNA. Prinsip dari teknik ini adalah sentrifugasi yang bertujuan untuk memisahkan substansi yang didasarkan pada ukuran molekul. Nantinya, substansi dengan ukuran yang lebih besar akan berada di dasar *tube* dan sebaliknya (Fatih, 2009). Pada proses sentrifugasi yang dilakukan untuk mendapatkan DNA murni dari *Salmonella* sp., kecepatan sentrifugasi yang digunakan adalah 13.000 rpm dengan waktu yang berbeda-beda antar perlakuannya (Liwana *et al.*, 2018).

Tahapan selanjutnya setelah perlakuan isolasi DNA adalah PCR. Tahapan ini memiliki tujuan yaitu untuk melipatgandakan segmen DNA sebanyak jutaan kali lipat secara *in vitro* dalam waktu yang relatif singkat. Beberapa hal yang harus ada dalam suatu tahapan PCR antara lain adalah DNA murni hasil isolasi, primer yang digunakan (dalam hal ini, primer yang digunakan adalah gen *marker invA* karena ingin mengetahui ada/tidaknya gen tersebut dalam *Salmonella* sp., *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), enzim DNA *polymerase*, dan juga larutan *buffer* yang berfungsi sebagai penyedia lingkungan sesuai untuk aktivitas DNA polimerase (Zuhriana, 2010). Untuk melakukan PCR, ada 3 tahapan yang terjadi. Ketiga tahapan tersebut adalah denaturasi yang berarti proses perubahan DNA dari *double strand* menjadi *single strand*, *annealing* yang berarti berpasangannya DNA *single strand* dengan primer, dan yang terakhir adalah pemanjangan yang berarti adanya replikasi berkali-kali lipat pada DNA dengan bantuan enzim yang dibutuhkan (Delidow *et al.*, 1993). Deteksi materi genetik menggunakan metode PCR memiliki beberapa keunggulan; butuh waktu yang relatif singkat, memiliki nilai sensitivitas yang tinggi yakni di atas 90%, dan bersifat spesifik terhadap informasi genetik yang diinginkan (Muhsinin *et al.*, 2018).

Setelah melakukan PCR, dilanjutkan ke tahapan selanjutnya yakni tahapan elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu teknik yang dilakukan dengan tujuan memisahkan molekul bermuatan melalui gel dengan memanfaatkan pengaruh medan listrik. Prinsip dari teknik ini adalah pergerakan partikel bermuatan negatif, dalam hal ini adalah DNA, yang bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif. Hasil yang didapatkan setelah melakukan teknik elektroforesis adalah adanya *band* yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi pada proses PCR dan memperlihatkan jumlah pasangan basa yang dimilikinya. Beberapa bahan yang perlu ada di proses ini adalah media berupa gel *agarose* yang dibuat menggunakan pelarut *buffer Tris Borate* (TBE) dan juga *loading dye* yang berfungsi sebagai suatu pemberat agar DNA dapat terbaca saat proses elektroforesis (Raddy *et al.*, 2012). Umumnya, untuk menganalisis DNA bakteri *Salmonella* sp., digunakan DNA *ladder* 100 bp sebagai marker DNA dengan fungsi untuk mengetahui ukuran pasang basa yang dihasilkan dari proses amplifikasi (Yanestria, *et al.*, 2019). Menurut

penelitian yang dilakukan oleh Liwan dan Budiarmo (2018), gen *invA* memiliki primer dengan sekuens nukleotida berupa 5'GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' dan 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'.

2.5 Uji Kepekaan Antibiotik

Uji kepekaan antibiotik memiliki definisi sebagai uji yang digunakan untuk mengetahui sensitivitas suatu bakteri terhadap satu/berbagai jenis antibiotik. Sesuai dengan definisinya, uji kepekaan ini bertujuan untuk mengetahui tingkat efektivitas dari suatu antibiotik untuk menyembuhkan suatu penyakit yang biasanya dibawah oleh mikroorganisme patogen. Hasil dari kepekaan/sensitivitas suatu bakteri terhadap suatu antibiotik biasanya ditandai dengan adanya diameter zona hambat yang terbentuk antara antibiotik dengan isolat bakterinya. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin sensitif juga suatu bakteri terhadap suatu antibiotik tertentu. Ada beberapa faktor yang dapat memengaruhi diameter zona hambat, antara lain adalah waktu absorpsi bakteri dalam media dan juga konsentrasi antibiotik yang digunakan (Khusuma *et al.*, 2019).

Uji kepekaan isolat memiliki standar acuannya tersendiri untuk menentukan apakah bakteri tersebut resisten atau sensitive terhadap suatu antibiotik. Ada 3 tingkat kepekaan isolat menurut standar yang ditetapkan oleh *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Ketiga tingkatan tersebut adalah sensitif, intermediet, dan resisten. Tingkat yang pertama adalah sensitif. Bakteri dikatakan berada di tingkat sensitif terhadap antibiotik apabila bakteri tersebut berhasil dihambat pertumbuhannya oleh suatu antibiotik dengan tidak adanya efek samping negatif yang ditimbulkan. Bakteri dikatakan berada di tingkat selanjutnya yakni intermediet apabila bakteri tersebut bisa dihambat pertumbuhannya oleh suatu bakteri namun tidak didukung dengan kepastian dari efek samping negatif yang dihasilkan. Yang terakhir adalah tingkatan yang paling rendah yakni resisten. Bakteri dikatakan resisten terhadap suatu antibiotik apabila antibiotik tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan isolat tersebut. Maka dari itu, apabila suatu bakteri dikatakan resisten terhadap suatu antibiotik, perlu digunakan jenis antibiotik lainnya agar dapat menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Dalam dunia medis,

apabila obat yang memiliki tingkat efektivitas resistensi tetap diberikan untuk mengobati suatu penyakit, maka yang terjadi adalah penyakit tersebut tidak dapat disembuhkan karena mikroorganisme penyebab tidak mati (Rodloff *et al.*, 2008). Untuk bakteri *Salmonella* sp., standar diameter zona hambat yang terbentuk adalah sensitif untuk ≥ 20 mm, intermediet untuk 15-19 mm, dan juga resisten apabila memiliki diameter zona hambat ≤ 14 mm (Brown *et al.*, 2016).

Untuk mengetahui tingkat kepekaan suatu isolat terhadap suatu/banyak jenis antibiotik, dapat digunakan beberapa metode. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah metode difusi cakram. Metode difusi cakram adalah metode yang paling sering digunakan untuk mengetahui aktivitas dari suatu mikroorganisme. Metode difusi cakram juga dikenal sebagai metode Kirby-Bauer. Cara kerja dari metode ini adalah menggunakan *cotton swab* yang berfungsi untuk mengambil bakteri pada media cair. Langkah selanjutnya adalah mengoleskan *cotton swab* pada permukaan media secara merata. Inkubasi kemudian dilakukan selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil dari metode ini nantinya akan berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling disk antibiotik. Daerah bening ini merupakan daerah yang menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk antara mikroorganisme dan antibiotik (Oktaviani *et al.*, 2019). Daerah bening yang terbentuk akan diukur lebarnya menggunakan alat ukur dengan pola vertikal, horizontal, dan juga diagonal.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset yang berada di Universitas Kristen Duta Wacana. Peneliti memilih laboratorium ini karena memiliki tingkat sanitasi yang paling tinggi serta laboratorium tersebut memiliki peralatan yang paling lengkap sesuai dengan topik penelitian yang diajukan.

3.1.2 Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Mei 2023.

3.2 Bahan

Isolat *S. typhi*, Amikacin, Ampicillin, Cefotaxime, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Tetracycline, media Brain Heart Infusion (BHI), media Mueller Hinton Agar (MHA), kit isolasi DNA (Presto Mini gDNA Bacteria Kit), kit PCR (Promega Kit Mastermix), gel agarose, buffer TBE, loading dye, etanol 70%, ddH₂O, kristal violet, lugol iodine, aseton alkohol, safranin, spiritus, akuades steril.

3.3 Alat

Thermocycler, apparatus elektroforesis, sentrifuge, inkubator, oven, waterbath, mikroskop, autoklaf, vortex, cotton swab, cawan petri, bunsen, micropipet, tabung reaksi, jarum ose, gelas beda, alat ukur (penggaris), marker, pipet tetes, eppendorf, tip, PCR tube, collection tube.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan terlebih dahulu sesuai dengan cara kerja yang telah dibuat. Untuk penggunaan bahan utama yaitu isolat dari *S. typhi* yang diambil dari sampel darah pasien (Amarantini *et al.*, 2011), dilakukan terlebih dahulu pengecekan kode isolat yang berada di Laboratorium Riset, Universitas Kristen Duta Wacana. Tujuan pengecekan kode isolat ini adalah untuk

memastikan jumlah isolat yang akan digunakan sebanding dengan data yang telah disimpan di *database*. Pembuatan media berupa *Brain Heart Infusion* (BHI) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA) juga dilakukan pada saat persiapan alat dan bahan.

3.4.2 Penumbuhan Kembali Bakteri

Digunakan beberapa isolat *S. typhi* yang didapatkan dari penelitian yang dilakukan oleh Amarantini dkk. (2011) yang sudah diistirahatkan. Isolat *S. typhi* ini didapatkan dari sampel darah pada pasien di Rumah Sakit Karitas di Nusa Tenggara Timur. Tujuan melakukan penumbuhan kembali bakteri adalah untuk mengaktifkan kembali metabolisme bakteri yang sudah lama tidak aktif agar dapat digunakan untuk melakukan uji tertentu (Wijayati *et al.*, 2014). Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara membuat media BHI cair sebanyak 3 ml pada tabung reaksi. Bakteri yang berada di tabung penyimpanan dipindahkan ke media BHI cair tersebut lalu dilakukan proses inkubasi. Proses inkubasi dilakukan selama 24-48 jam hingga terdapat kekeruhan pada media BHI cair tersebut. Bakteri yang berada di media BHI ini kemudian dibagi menjadi 2 langkah yang berbeda. Langkah yang pertama adalah memindahkan bakteri dari media BHI cair ke media miring yang ditaruh di tabung reaksi yang akan digunakan sebagai cadangan menggunakan jarum ose. Langkah yang kedua adalah mengkulturkan bakteri dari tabung reaksi berisi media BHI ke cawan petri yang sudah diisi media BHI sebagai tempat tumbuhnya bakteri *S. typhi* menggunakan jarum ose, kemudian dilakukan metode goresan *streak plate* dengan beberapa kuadran hingga mendapatkan isolat tunggal. Isolat tunggal yang sudah didapatkan kemudian dipindahkan kembali ke tabung reaksi baru berisi media miring BHI cair untuk selanjutnya dilakukan uji pengecatan gram. Uji pengecatan gram dilakukan menggunakan 4 reagen yaitu kristal violet, lugol iodine, aseton alkohol, dan juga safranin dengan waktu perendaman berturut-turut 1 menit, 1 menit, 30 detik, dan 45 detik. Hasil pengecatan gram *S. typhi* menurut pustaka akan menghasilkan warna merah muda karena merupakan bakteri berjenis gram-negatif. Setelah dilakukan pengamatan secara mikroskopis, isolat bakteri yang memiliki warna merah muda dan memiliki kenampakan morfologis yang sama, dapat digunakan sebagai sampel dalam penelitian karena merupakan isolat yang sudah murni.

3.4.3 Uji Sensitivitas

Beberapa isolat murni yang sudah diremajakan dan dapat digunakan sebagai sampel kemudian dilakukan pengecekan kepekaannya terhadap antibiotik. Isolat *S. typhi* ditumbuhkan pada media Mueller Hinton Agar (MHA) di cawan petri dengan cara merendam *cotton swab* ke dalam media BHI cair berisi isolat, kemudian dioleskan secara merata pada permukaan media MHA. Antibiotik yang digunakan pada penelitian kali ini adalah *ampicillin*, *cefotaxime*, *ceftazidime*, *imipenem*, *meropenem*, *piperacillin*, *gentamicin*, *tetracycline*, *amikacin*, dan juga *ciprofloxacin* (Mileva *et al.*, 2020). Langkah selanjutnya adalah melakukan proses inkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, pengamatan dapat dilakukan. Pengamatan dilakukan dengan mengamati dan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk. Zona hambat diukur dengan mengukur lebar secara diagonal, vertikal, dan horizontal yang nantinya akan dijumlahkan kemudian dirata-ratakan. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin tinggi pula efektivitas antibiotik tersebut dan sebaliknya. Setelah dilakukan pada zona hambat yang terbentuk, profil resistensi dapat dikategorikan berdasarkan standar yang dikeluarkan oleh *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) yaitu sensitif untuk ukuran ≤ 14 mm, intermediet untuk 15-19 mm, dan juga resisten untuk zona hambat dengan ukuran ≥ 20 mm.

3.4.4 Uji Keberadaan Gen *invA*

Semua isolat *S. typhi* yang bersifat resisten terhadap antibiotik untuk dilakukan pengujian keberadaan gen *invA* sebagai faktor virulensi terbesar yang dimiliki bakteri ini. Proses deteksi gen tersebut meliputi isolasi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan juga elektroforesis. Mula-mula, bakteri *Salmonella typhi* yang berasal dari stok (media miring BHI) dikulturkan kembali pada media cair BHI yang kemudian diambil untuk melewati serangkaian proses isolasi DNA. Tahapan isolasi DNA meliputi 5 kegiatan utama yaitu preparasi sampel, *lysis*, DNA *binding*, *washing*, dan elusi. Proses tahapan isolasi DNA menggunakan suatu *kit* yang berasal dari *Presto Mini gDNA Bacteria Kit by Geneaid* (2017). Secara singkat, bakteri *Salmonella typhi* yang sudah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C pada media cair BHI diambil sebanyak 1,5 ml dan dipindahkan ke *microtube*

1,5 ml. Untuk mendapatkan supernatan, dilakukan proses sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit. Setelah itu, penambahan larutan seperti *GT Buffer*, *Proteinase K*, *GB Buffer*, *RNAse*, dan lainnya pun dilakukan. Langkah selanjutnya adalah proses inkubasi selama 2 jam di waterbath dengan suhu 60-70°C. Microsentrifuge kemudian disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan yang sama yaitu 13.500 rpm. Masuk ke tahap *washing*, *W1 buffer* dan *washing buffer* pun ditambahkan untuk menghilangkan pengotor selain DNA yang terdapat pada sampel. Sampel dimasukkan ke *GD column* yang ditaruh di atas *microtube* 1,5 ml baru setelah itu disentrifugasi untuk menyisahkan peletnya saja. Setelah itu, pelet ditambahkan *elution buffer* dan DNA pun berhasil diisolasi. DNA yang sudah diisolasi disimpan pada suhu 2-4°C. Hasil DNA yang berupa elusi akan dipakai guna melakukan tahapan selanjutnya yakni elektroforesis. Elektroforesis dilakukan sebanyak 2 kali yaitu setelah isolasi DNA dengan tujuan untuk mengetahui apakah DNA sudah terisolasi secara murni dan setelah proses PCR dengan tujuan untuk melihat ada/tidaknya gen target sesuai dengan marker yang digunakan. Elektroforesis sendiri memiliki prinsip memanfaatkan medan listrik agar migrasi DNA dari kutub negatif ke positif dapat berlangsung (Langga, *et al.*, 2012). Hasil dari tahapan elektroforesis pertama dilihat menggunakan *ultraviolet viewer* karena hanya ingin melihat ada atau tidaknya pita DNA yang terbentuk. Setelah hasil elektroforesis pertama menunjukkan bahwa DNA sudah diisolasi secara sempurna (gambar 4.3), masuk ke dalam proses selanjutnya yaitu PCR. Jumlah siklus PCR yang digunakan adalah sebanyak 35 siklus/pengulangan. Marker yang digunakan adalah marker IAF dengan urutan basa berupa 5' GTG-AAA-TTA-TCG-CCA-CGT-TCG-GGC-AA 3' dan IAR 5' TCA-TCG-CAC-CGT-CAA-AGG-ACC-C 3' dengan kondisi PCR yaitu:

Tabel 3. 1 Kondisi PCR *Salmonella typhi*

| Tahapan | Suhu (°C) | Waktu |
|------------------|-----------|----------|
| Pre-denaturasi | 95 | 5 menit |
| Denaturasi | 94 | 30 detik |
| <i>Annealing</i> | 62 | 1 menit |
| Ekstensi | 72 | 30 detik |
| Ekstensi akhir | 72 | 10 menit |

(Chaudhary, *et al.*, 2015)

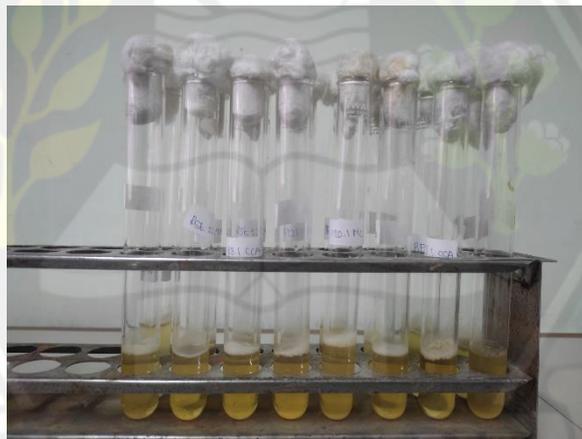
Setelah proses PCR selesai, dilakukan elektroforesis. Sebelum dilakukan elektroforesis, pembuatan gel harus dilakukan terlebih dahulu. Setelah gel mengeras, pada alat elektroforesis disimpan cetakan gel tadi. DNA yang merupakan hasil dari proses PCR diberikan *loading dye* yang berfungsi sebagai pewarna agar DNA dalam sumur dapat terbaca dan dapat dijadikan sebagai tanda arah perpindahan DNA. Setelah semua siap, hubungkan alat elektroforeis dengan arus listrik hingga DNA mencapai ujung gel. Setelah itu, gel dikeluarkan lalu dilihat dengan cahaya UV. Ukuran pasangan basa yang terbentuk kemudian dapat diamati dan didokumentasikan pada alat bernama *GelDoc*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan selama 2 bulan dari bulan Maret hingga Mei 2023 di Laboratorium Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana dengan menggunakan 14 jenis isolat *S. typhi* yang diambil dari darah pasien penelitian yang dilakukan oleh Amarantini dkk. (2011) dan juga 10 jenis antibiotik dengan 4 kelas yang berbeda.

Isolat *S. typhi* yang disimpan pada gliserol dengan suhu 2°C kemudian ditumbuhkan kembali di media Brain Heart Infusion (BHI) dengan tujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri tersebut. Pertumbuhan bakteri yang baik ditandai dengan adanya kekeruhan pada media cair (Gambar 4.1). Setelah bakteri berhasil ditumbuhkan kembali, kemudian dilakukan pengecatan gram untuk menguji kenampakan morfologis serta mengetahui kemurnian dari bakteri yang telah dikulturkan kembali.



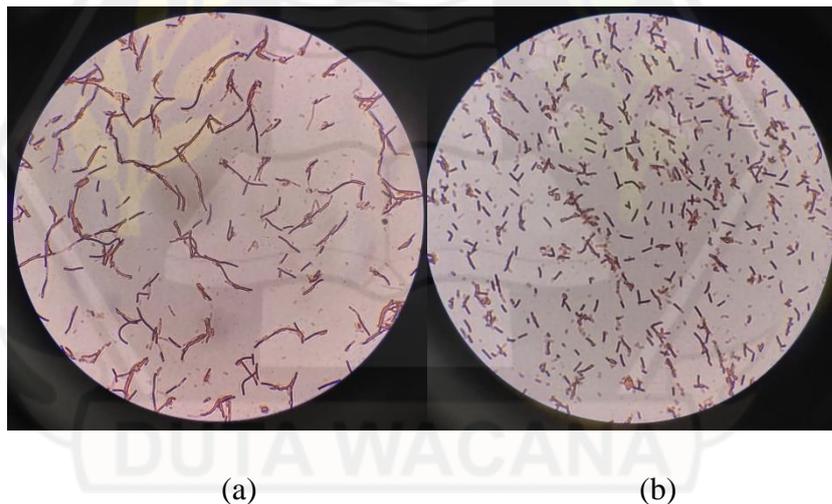
Gambar 4. 1 Pertumbuhan Isolat *S. typhi* pada media BHI cair

4.1 Pemeriksaan Kemurnian Kultur

Pemeriksaan kemurnian kultur dilakukan menggunakan metode pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan untuk membedakan jenis gram bakteri yang didasarkan pada ketebalan peptidoglikannya (Purwaningsih *et al.*, 2021).

Pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan 4 reagen yang berbeda. Adapun prosedur pewarnaan gram adalah yang pertama diberikan reagen crystal

violet yang berwarna ungu dengan fungsi sebagai pewarna primer selama 1 menit. Kemudian, ditambahkan reagen kedua yakni lugol iodine yang berfungsi sebagai larutan mordant atau penegas, sehingga warna yang dihasilkan oleh kristal violet akan lebih jelas lagi. Warna ungu dari kedua reagen tersebut diikat oleh dinding sel/peptidoglikan yang dimiliki bakteri. Untuk membedakan kedua jenis bakteri, perlu diberikan reagen aseton alkohol yang berfungsi untuk meluruhkan pewarna yang dihasilkan dari kedua reagen sebelumnya. Bakteri gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal sehingga ketika diberikan reagen peluruh, peptidoglikan tetap dapat mampu mempertahankan warna ungu. Berbanding terbalik dengan gram negatif yang peptidoglikannya tipis, pewarna dari reagen kristal violet dan lugol iodine tidak dapat dipertahankan sehingga warna bakteri akan menjadi luruh dan bakteri menjadi tidak berwarna (Hamidah *et al.*, 2019). Setelah bakteri gram negatif tidak memiliki warna, diberikan reagen terakhir yaitu safranin yang berwarna *pink* dengan tujuan sebagai kontras sehingga kedua jenis bakteri dapat dibedakan (Nurhidayati *et al.*, 2015).



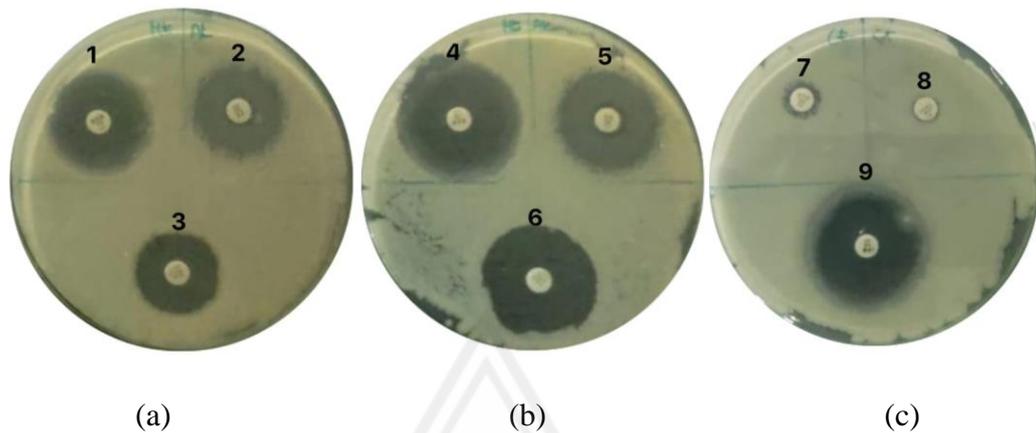
Gambar 4. 2 Kenampakan morfologis sel *S. typhi* hasil pewarnaan gram
Keterangan: (a) BPE 120.1 MC, (b) BPE 121.1 MC

Berdasarkan hasil pewarnaan gram yang telah dilakukan terhadap 14 jenis isolat, semua isolat memiliki kenampakan morfologis yang sama yaitu berwarna pink dan berbentuk basil (Gambar 4.2). Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kasim pada tahun 2020, bakteri *S. typhi* memiliki ciri yaitu berbentuk basil

dan merupakan bakteri gram negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa *S. typhi* yang telah dikulturkan kembali sudah murni dan dapat digunakan untuk metode selanjutnya yaitu pengujian sifat resistensi terhadap antibiotik.

4.2 Profil Resistensi *S. typhi* terhadap Antibiotik

Isolat *S. typhi* yang sudah memiliki kenampakan morfologis yang sama dengan bentuk basil dan berjenis gram negatif, kemudian dilakukan uji resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik. Hasil uji resistensi antibiotik diketahui berdasarkan ukuran zona hambat yang terbentuk (Gambar 4.3). Menurut CLSI (2021), standar sifat resistensi *S. typhi* terhadap antibiotik dibedakan menjadi beberapa kategori, yaitu: sensitif untuk ukuran zona hambat >19mm, intermediet untuk ukuran zona hambat 15-19mm, dan resisten untuk ukuran zona hambat <14mm. Ada 5 kelas antibiotik dan 10 jenis antibiotik yang diuji terhadap *S. typhi*. Kelas yang pertama adalah penicillin dengan antibiotik *ampicillin* (20µg) dan *piperacillin* (110µg). Selanjutnya kelas carbapenem dengan antibiotik *imipenem* (10µg) dan *meropenem* (µg). Selain itu, 2 jenis antibiotik yang termasuk dalam kelas cephalosporins juga diuji. Kedua antibiotik tersebut adalah *cefotaxime* (30µg) dan *ceftazidime* (30µg). *Gentamicin* (10µg) dan *amikacin* (30µg) yang termasuk dalam kelas *aminoglycoside* juga diuji untuk mengetahui sifat resistensinya. Kedua kelas terakhir yang diuji adalah *tetracycline* (30µg) dan *quinolone* dengan antibiotik berjenis *ciprofloxacin* (5µg).

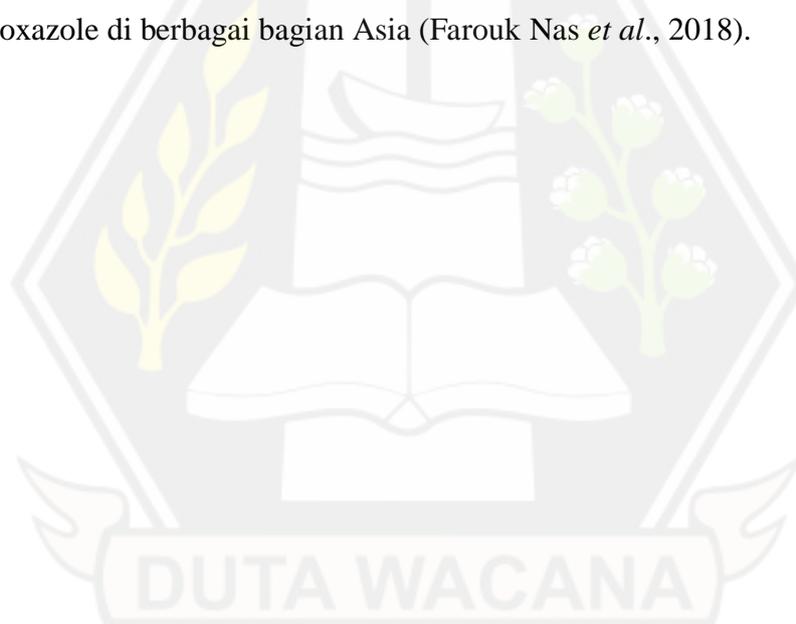


Gambar 4. 3 Zona hambat isolat *S. typhi* terhadap antibiotik
Keterangan isolat: (a) BPE 122.4 CCA, (b) RSK 22.2 CCA, (c) BPE 122.4 CCA
Keterangan antibiotik: (1) *Meropenem*, (2) *Tetracycline*, (3) *Piperacillin*, (4) *Meropenem*, (5) *Tetracycline*, (6) *Piperacillin*, (7) *Cefotaxime*, (8) *Ceftazidime*, (9) *Imipenem*

Pola sensitivitas antibiotik terhadap *S. typhi* diuji menggunakan antibiotik komersial (Oxoid). Tiga kategori antibiotik digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik yang menghambat dinding sel, antibiotik yang menghambat sintesis protein, dan antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat. Berdasarkan hasil pengujian resistensi *S. typhi* terhadap antibiotik (Tabel 4.1), terlihat bahwa *piperacillin* dan *imipenem* paling efektif untuk menghambat/mematikan pertumbuhan dari *S. typhi* zona hambat di atas 20 mm. Semua isolat yang diuji dengan menggunakan kedua antibiotik ini memiliki profil resistensi yang bersifat sensitif. Kedua kelas antibiotik ini tergolong sebagai antibiotik dengan mekanisme menghambat terjadinya sintesis pada dinding sel. Mekanisme kerja antibiotik dalam hubungannya dengan menghambat pembentukan dinding sel adalah dengan cara mengikat asam amino *D-alanyl-D-alanine* sebagai komponen struktur dinding sel sehingga lapisan pembentuk peptidoglikan yaitu N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin tidak dapat terikat. (Ghooi *et al.*, 1995). Berdasarkan temuan ini maka *S. typhi* sensitif terhadap *piperacillin* dan *imipenem*.

Selanjutnya masih dalam kategori penghambatan terhadap dinding sel, diketahui pula bahwa *meropenem* juga tergolong sangat efektif dalam menghambat isolat uji *S. typhi*, kecuali terhadap isolat kontrol *S. typhi* NCTC 786. Tabel 4.1 juga

menunjukkan bahwa tiga dari enam antibiotik kategori penghambat dinding sel, yaitu *ceftazidime*, *cefotaxime*, dan *ampicillin* tergolong kurang efektif dalam menghambat seluruh isolat yang diuji. *Ceftazidime* hanya mampu menghambat pertumbuhan empat isolat uji dari total 14 isolat yang diujikan, *cefotaxime* mampu menghambat pertumbuhan lima isolat uji dari total 14 isolat yang diujikan. Hanya enam dari total 14 isolat yang diujikan bersifat sensitif terhadap *ampicillin*. Sebagian besar isolat *S. typhi* yang diuji sudah menunjukkan resistensi terhadap *ceftazidime*, *cefotaxime* dan *ampicillin*. Temuan serupa bahwa resistensi terhadap *ampicillin* juga ditemukan pada isolat *S. typhi* yang diuji di Laboratorium Mikrobiologi di Abdullahi waste Specialist, Kano. Lebih lanjut juga disampaikan bahwa resistensi terhadap *ampicillin* secara signifikan tinggi dalam penelitian yang dilakukan di sebagian besar dunia. Plasmid juga diketahui menjadi perantara terjadinya *multi-drug resistance* terhadap *ampicillin*, chloramphenicol, dan cotrimoxazole di berbagai bagian Asia (Farouk Nas *et al.*, 2018).



Tabel 4.1 Hasil uji resistensi isolat *Salmonella typhi* terhadap antibiotik

| Isolates | Tipe Antibiotik | | | | | | | | | | | | | | MAR Index | |
|--------------------------|-----------------|--------------|----------|-----------|------------|-------------|------------|----------|--------------|---------------|--|--|--|--|-----------|-----|
| | Dinding Sel | | | | Protein | | | | Asam Nukleat | | | | | | | |
| | Ampicillin | Piperacillin | Imipenem | Meropenem | Cefotaxime | Ceftazidime | Gentamicin | Amikacin | Tetracycline | Ciprofloxacin | | | | | | |
| RSL 3.1 SSA | 2,7 | 26 | 28,3 | 29,3 | 3 | 0 | 18,3 | 20,3 | 21,7 | 23,3 | | | | | | 0,3 |
| RSK 5.1 SSA | 29 | 34 | 30,3 | 23 | 28 | 20 | 9,3 | 21,3 | 23,7 | 19,3 | | | | | | 0,1 |
| RSK 32.1 CCA | 11 | 26,3 | 30 | 29 | 9,3 | 0 | 14 | 14,7 | 26,7 | 27,7 | | | | | | 0,4 |
| RSK 22.2 CCA | 19,3 | 28 | 39,3 | 32,3 | 8,7 | 10,7 | 17,3 | 25,3 | 26,7 | 19 | | | | | | 0,2 |
| RSK 22.4 CCA | 32 | 24,3 | 31,7 | 27,3 | 0 | 0 | 13,3 | 9 | 29,3 | 23,7 | | | | | | 0,4 |
| BPE 7.10 MC | 11,7 | 26 | 35,3 | 31,7 | 11 | 8,3 | 21 | 20 | 25 | 26,7 | | | | | | 0,3 |
| BPE 120.1 MC | 27,3 | 38 | 35,7 | 28,7 | 30 | 18 | 16,3 | 12,7 | 28,6 | 12,7 | | | | | | 0,2 |
| BPE 121.1 MC | 13 | 23 | 28,7 | 22 | 6,3 | 0 | 12 | 13,3 | 24 | 25,6 | | | | | | 0,5 |
| BPE 127.1 MC | 34,7 | 30,7 | 33,3 | 25 | 25,3 | 22,7 | 13,3 | 11,3 | 11 | 24,3 | | | | | | 0,3 |
| BPE 127.2 MC | 29,3 | 35,3 | 34,3 | 28,7 | 36,3 | 24,3 | 10,7 | 10,7 | 30 | 20,3 | | | | | | 0,2 |
| BPE 74.1 CCA | 23,7 | 35,3 | 28,3 | 25,7 | 17,7 | 0 | 17 | 10 | 29 | 22 | | | | | | 0,2 |
| BPE 122.4 CCA | 12,7 | 21,3 | 28,7 | 24,7 | 10 | 6,7 | 14 | 8,7 | 25,7 | 25 | | | | | | 0,5 |
| BPE 123.1 CCA | 12 | 22 | 31,7 | 25,7 | 15 | 9,7 | 15,7 | 18,7 | 22,7 | 31 | | | | | | 0,2 |
| <i>S. typhi</i> NCTC 786 | 34,7 | 26 | 31,7 | 19,3 | 33,7 | 23 | 11,3 | 25,3 | 35 | 23 | | | | | | 0,1 |

Deskripsi: Putih = sensitif, zona hambat ≥ 20 mm; Abu = intermediet, zona hambat 14-19 mm; Hitam = resisten, zona hambat ≤ 14 mm. Semua angka memiliki satuan milimeter, kecuali MAR Index.

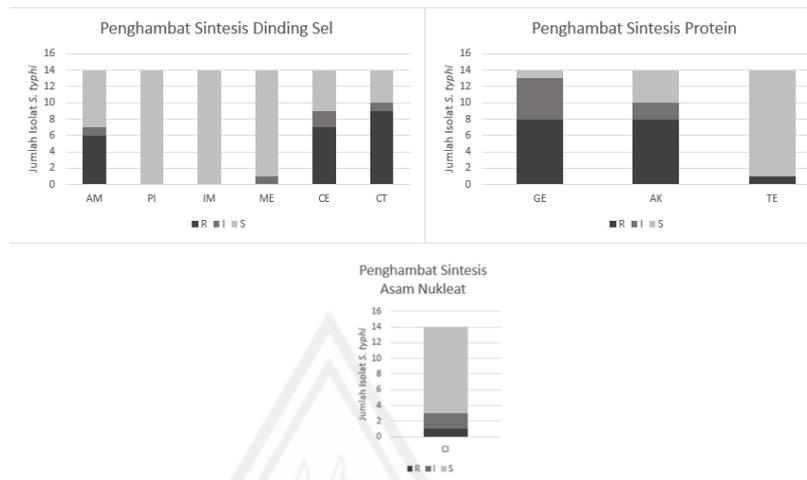
Kategori antibiotik selanjutnya yang diuji adalah golongan penghambat sintesis protein. Ada 3 antibiotik yang digunakan yaitu *gentamicin*, *amikacin*, dan tetrasiklin. Menurut hasil penelitian, *gentamicin* dan *amikacin* dinilai belum efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* karena hanya berhasil menghambat 7 isolat untuk *gentamicin* dan 8 isolat untuk *amikacin* dari total pengujian terhadap 14 isolat uji. Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mandal *et al*, (2009) yang mengatakan bahwa *amikacin* dan *gentamicin* tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. typhi*. Hal ini disebabkan karena sulitnya antibiotik golongan *aminoglycoside* untuk menembus jaringan sel bakteri patogen yang bersifat intraseluler. Maka dari itu, bakteri menjadi tetap aktif dan bersifat infeksius terhadap inangnya (Mandal *et al*, 2009). Berbanding terbalik dengan 2 kelas antibiotik lainnya, tetrasiklin memiliki hasil uji yang sangat efektif untuk menghambat pertumbuhan *S. typhi*. Isolat dengan kode BPE 127.1 MC merupakan satu-satunya isolat yang memiliki profil resisten terhadap antibiotik ini. Berdasarkan hasil ini, dapat diketahui bahwa tetrasiklin berhasil menghambat sintesis protein bakteri *S. typhi*. Mekanisme tetrasiklin dalam menghambat terjadinya sintesis protein adalah dengan melakukan interaksi dengan subunit ribosom bakteri 30S sehingga akan mencegah terjadinya pengikatan oleh tRNA dalam asam amino. Kegagalan tRNA dalam melakukan pengikatan akan menyebabkan terjadinya penghambatan kodon dan antikodon yang membuat kegagalan proses translasi sehingga menyebabkan tidak tersedianya energi bagi bakteri untuk melakukan sintesis protein. (Anggita *et al.*, 2022).

Ciprofloxacin merupakan antibiotik golongan quinolone dengan mekanisme menghambat sintesis asam nukleat pada bakteri. Berdasarkan hasil (Tabel 4.1), *ciprofloxacin* berhasil menghambat pertumbuhan 11 isolat dari total 14 isolat *S. typhi* yang diuji dengan catatan 2 isolat memiliki profil intermediet. Efektivitas antibiotik ini dalam menghambat *S. typhi* didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Girgis (1999) dengan sampel *S. typhi* dari darah manusia. Penelitian ini mengatakan bahwa antibiotik *ciprofloxacin* bersifat efektif untuk menghambat pertumbuhan *S. typhi*, namun dalam penggunaannya perlu dilakukan inovasi karena penggunaan antibiotik ini untuk menghambat *S. typhi* sudah mulai menunjukkan

adanya penurunan efektivitas karena tidak adanya inovasi dari tahun ke tahun (Mutai *et al.*, 2018). Antibiotik golongan penghambat sintesis asam nukleat memiliki mekanisme kerja dengan cara mengintervensi terjadinya replikasi DNA. Antibiotik dapat mengintervensi dengan cara mengikat enzim topoisomerase 2 sebagai enzim esensial yang mengatur terjadinya replikasi DNA. Enzim topoisomerase 2 yang terikat dengan antibiotik akan menyebabkan rusaknya enzim ini sehingga DNA dalam bakteri tidak dapat bereplikasi (Bhattacharjee 2022).

Selanjutnya, pada tabel terdapat kolom berupa MARI. MARI merupakan *Multiple Antimicrobial Resistance Index*. Indeks ini merupakan indikator yang efektif dan juga valid untuk mengetahui sifat resistensi suatu isolat terhadap beberapa jenis antibiotik yang diuji. Cara mendapatkan nilai MARI adalah dengan cara melakukan perbandingan antara antibiotik yang resisten dengan keseluruhan antibiotik yang diuji terhadap 1 isolat yang sama. Semakin besar nilai MARI, pertumbuhan isolat semakin susah dihambat dan begitu juga sebaliknya. Nilai MARI tertinggi dimiliki oleh isolat BPE 121.1 MC dengan nilai 0,5 yang berarti sifat resistensi isolat ini tinggi terhadap berbagai jenis antibiotik. Sedangkan nilai MARI terkecil dimiliki oleh 2 isolat yaitu RSK 5.1 SSA dan kontrol berupa *S. typhi* NCTC 786 dengan nilai MARI 0,1. Hal ini menandakan isolat tersebut lebih mudah dihambat pertumbuhannya oleh berbagai jenis antibiotik (Ayandele *et al.*, 2020).

Secara keseluruhan hasil uji resistensi antibiotik dapat digambarkan profilnya seperti pada Gambar 4.4. Berdasarkan profil resistensi isolat *S. typhi* terhadap 10 jenis antibiotik yang berbeda (Gambar 4.4), diketahui bahwa antibiotik yang paling efektif untuk menghambat *S. typhi* adalah *piperacillin* dan *imipenem* dengan kategori penghambatan sintesis dinding sel. Hasil uji resistensi juga menunjukkan bahwa tidak semua antibiotik kategori penghambat dinding sel efektif melawan *S. typhi*. Antibiotik kategori penghambat dinding sel yang paling tidak efektif terhadap *S. typhi* adalah *ceftazidime* dengan kemampuan hanya dapat menghambat 3 isolat uji dari 14 isolat.



Gambar 4. 4 Profil resistensi *S. typhi* terhadap antibiotik

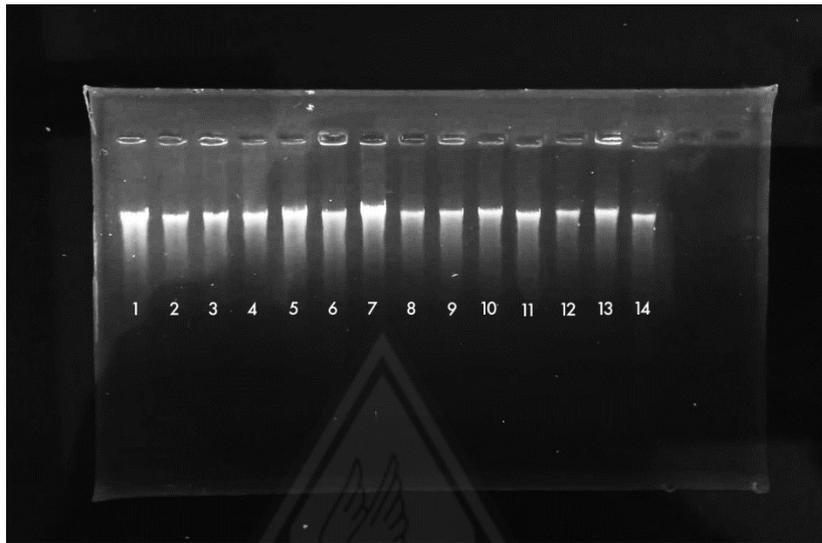
Keterangan: Penghambat sintesis dinding sel: Ampicillin (AM), Piperacillin (PI), Imipenem (IM), Meropenem (ME), Cefotaxime (CE), Ceftazidime (CT); Penghambat sistesis protein: Gentamicin (GE), Amikacin (AK), Tetracycline (TE); Penghambat sintesis asam nukleat: Ciprofloxacin (CI)

Profil Gambar 4.4. juga menunjukkan bahwa *tetracycline* merupakan antibiotik yang memberikan efek hambat lebih kuat dibandingkan *gentamicin* dan *amikacin*. Berdasarkan hasil ini, maka diperlukan kewaspadaan terhadap segala penggunaan antibiotik yang memiliki sifat resistensi tinggi ataupun dilakukan inovasi seperti perlakuan kombinasi antibiotik agar bakteri tidak mampu mengenali materi genetik penyusun dari antibiotik tersebut.

4.3 Deteksi Gen *invA*

Dilakukan suatu rangkaian proses untuk mendeteksi ada/tidaknya keberadaan gen *invA* yang bersifat invasif di dalam isolat *S. typhi* yang telah diuji sifat resistensinya. Pengujian keberadaan gen invasif ini ditujukan karena gen ini merupakan faktor virulensi terpenting untuk mengetahui apakah isolat bakteri tersebut bersifat patogen atau tidak (Yanestria *et al.*, 2019).

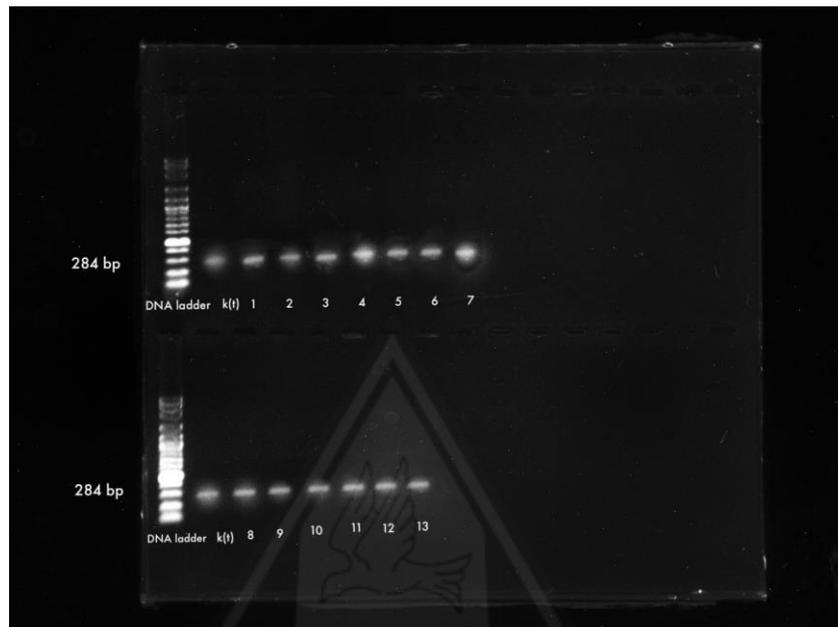
Tahapan awal untuk mendeteksi keberadaan gen *InvA* adalah dengan cara melakukan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan mengikuti prosedur yang dikeluarkan oleh Presto Mini gDNA Bacteria Kit by Geneaid. Setelah isolasi DNA berhasil dilakukan, hasil DNA pun divisualisasikan menggunakan metode elektroforesis gel *agarose*. Terbentuknya pita DNA di gel *agarose* menandakan bahwa DNA sudah terisolasi dengan baik (Gambar 4.5).



Gambar 4. 5 Hasil elektroforesis isolasi DNA isolat *S. typhi*

Keterangan: (1) BPE 74.1 CCA, (2) RSK 22.4 CCA, (3) RSK 32.1 SSA, (4) RSL 3.1 SSA, (5) BPE 120.1 MC, (6) BPE 127.1 MC, (7) BPE 122.4 CCA, (8) BPE 123.1 CCA, (9) RSK 5.1 SSA, (10) BPE 121.1 MC, (11) BPE 7.10 MC, (12) RSK 22.2 CCA, (13) BPE 127.2 MC, (14) *S. typhi* NCTC 786

Selanjutnya, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan untuk mengamplifikasi basa nukleotida yang ditemui pada *S. typhi*. Basa nukleotida yang sudah diamplifikasi memudahkan untuk mengetahui keberadaan dan jumlah pasangan basa yang dimiliki oleh target gen *invA* pada *S. typhi*.

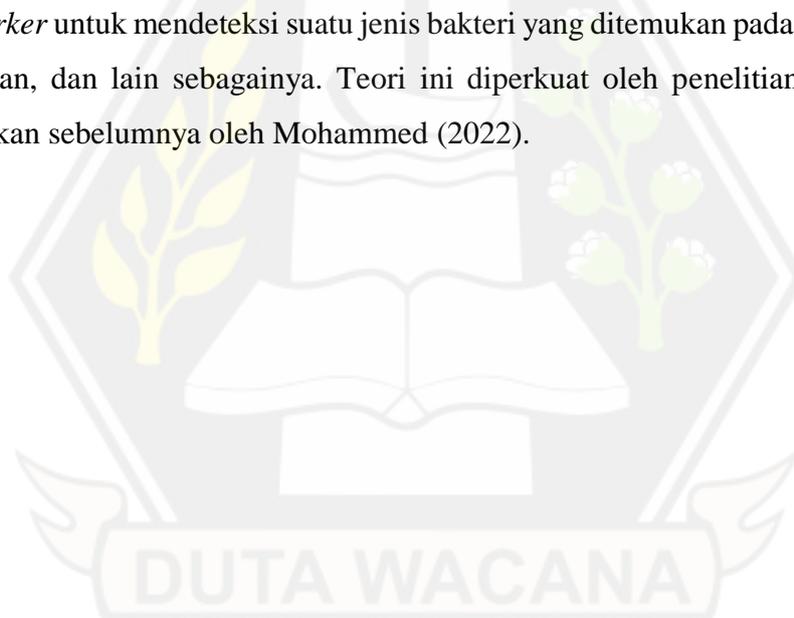


Gambar 4. 6 Amplikon gen *invA* hasil elektroforesis

Keterangan: (K (+)) Kontrol positif *S. typhi* NCTC 786, (1) BPE 74.1 CCA, (2) RSK 22.4 CCA, (3) RSK 32.1 SSA, (4) RSL 3.1 SSA, (5) BPE 120.1 MC, (6) BPE 127.1 MC, (7) BPE 122.4 CCA, (8) BPE 123.1 CCA, (9) RSK 5.1 SSA, (10) BPE 121.1 MC, (11) BPE 7.10 MC, (12) RSK 22.2 CCA, (13) BPE 127.2 MC

Primer IAF (5' GTG-AAA-TTA-TCG-CCA-CGT-TCG-GGC-AA 3') dan primer IAR (5' TCA-TCG-CAC-CGT-CAA-AGG-ACC-C 3') digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gen *invA* dalam *S. typhi*. Penggunaan primer ini didasarkan pada sifat spesifitas yang tinggi terhadap untaian DNA yang dimiliki oleh gen *invA* (target) sehingga primer ini akan secara spesifik mengamplifikasi daerah SPI-1 tempat dimana gen ini berada pada *S. typhi* (Li *et al.*, 2013). Gen *invA* memiliki sifat *highly conserved* yang berarti gen tersebut tidak akan mengalami mutasi selama proses evolusi terjadi. Maka dari itu, penggunaan primer IAF dan IAR tidak akan mendeteksi keberadaan gen lain pada daerah SPI-1 tersebut (Mohammed *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil elektroforesis setelah PCR yang menggunakan gel *agarose* 0,8%; didapatkan hasil sebagai berikut (Gambar 4.5). Hasil elektroforesis dibaca menggunakan *GelDoc* agar ukuran pasangan basa dapat lebih diamati dengan teliti. Untuk mengetahui ukuran dari pasangan basa yang dimiliki oleh gen, ditambahkan DNA *marker* 1000 bp keluaran Vivan Technologies sebagai acuan dari ukuran pasangan basa (Artati, *et al.*, 2017).

Pada penelitian kali ini, digunakan kontrol positif yang merupakan isolat uji *S. typhi* NCTC 786 untuk dijadikan sebagai acuan untuk melihat hasil elektroforesis isolat uji lainnya. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rahn pada tahun 1992 sebagai penelitian perdana tentang keberadaan gen *invA* pada *S. typhi*, ukuran basa fragmen DNA dari gen *invA* yang dimiliki oleh *S. typhi* adalah sebesar 284 pasangan basa. Hal tersebut dikonfirmasi oleh hasil yang dapat dibaca di elektroforesis dengan adanya pita DNA di kolom 284 pasangan basa baik kontrol positif maupun isolat *S. typhi* lainnya. Adanya pita basa DNA yang divisualisasikan menggambarkan bahwa semua isolat memiliki gen *invA* yang berukuran 284 pasangan basa. Maka dari itu, dapat diyakini bahwa semua isolat *S. typhi* yang dianalisis mempunyai gen *invA* sebagai salah satu penyebab bakteri ini bersifat patogen dalam tubuh manusia (Yulian, *et al.*, 2020). Keberadaan gen *invA* dalam semua isolat *S. typhi* menunjukkan bahwa gen ini dapat dijadikan sebagai *biomarker* untuk mendeteksi suatu jenis bakteri yang ditemukan pada sampel darah, makanan, dan lain sebagainya. Teori ini diperkuat oleh penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya oleh Mohammed (2022).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa:

1. Gen *invA* yang berukuran 284 pasangan basa terdeteksi dalam setiap isolat *S. typhi* yang diuji.
2. Profil resistensi antibiotik dari isolat *S. typhi* terhadap kesepuluh jenis antibiotik sangat beragam. Isolat *S. typhi* sangat sensitif terhadap *imipenem* dan *piperacillin*. Sedangkan *ceftazidime* tergolong antibiotik yang paling tidak efektif menghambat *S. typhi*. Isolat *S. typhi* NCTC 786 dan RSK 5.1 SSA merupakan strain yang paling mudah dihambat pertumbuhannya dengan berbagai antibiotik, sedangkan isolat BPE 121.1 MC merupakan bakteri yang paling sulit dihambat pertumbuhannya.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah penggunaan antibiotik yang bersifat resisten dapat dikombinasikan satu sama lain untuk menghasilkan hasil penghambatan yang efektif terhadap pertumbuhan *S. typhi*. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian mengenai penggunaan marker virulensi selain *invA* seperti *sivH*, *agfA*, dan *spvC* untuk mengetahui sifat patogenitas dari bakteri *S. typhi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarantini, C., Sembiring, L., Kushadiwijaya, H., & Asmara, W. (2011). Identification and characterization of *Salmonella typhi* isolates from Southwest Sumba District, East Nusa Tenggara based on 16S rRNA gene sequences. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 12(1).
- Amin, L. Z. (2014). Pemilihan antibiotik yang rasional. *Medicinus*, 27(3), 40-45.
- Anggita, D., Nurisyah, S., & Wiriansya, E. P. (2022). Mekanisme Kerja Antibiotik. *UMI Medical Journal*, 7(1), 46-58.
- Apriani, L., Rahmawati, R., & Kurniatuhadi, R. (2019). Deteksi Bakteri *Salmonella* dan *Shigella* Pada Makanan Burger di Sungai Raya Dalam Pontianak. *Jurnal Protobiont*, 8(3).
- Ayandele, A. A., Oladipo, E. K., Oyebisi, O., & Kaka, M. O. (2020). Prevalence of multi-antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species obtained from a tertiary medical institution in Oyo State, Nigeria. *Qatar medical journal*, 2020(1), 9.
- Baktir, A. (2017). DNA Struktur dan Fungsi. Airlangga University Press Book.
- Bhattacharjee, M. K. (2022). Antibiotics that inhibit nucleic acid synthesis. In *Chemistry of antibiotics and related drugs* (pp. 125-148). Cham: Springer International Publishing.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Brown, D. F., Wootton, M., & Howe, R. A. (2016). Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 3-5.
- Chaudhary, J. H., Nayak, J. B., Brahmabhatt, M. N., & Makwana, P. P. (2015). Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary world*, 8(1), 121.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 27th ed CLSI supplement M100 (Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne USA, 2017), pp. 1-4.
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (1993). Polymerase chain reaction: basic protocols. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 15, 1-29. <https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:1>.
- Faatih, M. (2009). Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Pendidikan Biologi: Surakarta*.

- Geneaid. (2017). *Presto Mini gDNA Bacteria Kit*. Retrieved from <https://geneaid.com/data/files/1605607121092544801.pdf>
- Ghooi, R. B., & Thatte, S. M. (1995). Inhibition of cell wall synthesis—is this the mechanism of action of penicillins?. *Medical hypotheses*, 44(2), 127-131.
- Girgis, N. I., Butler, T., Frenck, R. W., Sultan, Y., Brown, F. M., Tribble, D., & Khakhria, R. (1999). Azithromycin versus *ciprofloxacin* for treatment of uncomplicated *tifoid* fever in a randomized trial in Egypt that included patients with multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1441-1444.
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon, R. (2019). Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11-21.
- esculenta L.) againts *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.)*, 3(5), 750-759.
- Istini, I. (2020). Pemanfaatan Plastik Polipropilen Standing Pouch Sebagai Salah Satu Kemasan Sterilisasi Peralatan Laboratorium. *Indonesian Journal of Laboratory*, 2(3), 41-46.
- Jeon, H. Y., Kim, Y. B., Lim, S. K., Lee, Y. J., & Seo, K. W. (2019). Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010–2017. *Poultry science*, 98(2), 957-965.
- Karmi, M. (2013). Detection of virulence gene (*InvA*) in *Salmonella* isolated from meat and poultry products. *Int. J. Genet*, 3(2), 7-12.
- Kasim, V. N. A. (2020). Peran Imunitas Pada Infeksi *S. typhi*. *Gorontalo: CV Athra Samudra*.
- Kelly, M., Lampard, G., & Knapp, C. (2010). The Gel Documentation System: A Cornerstone to the Implementation of the Introduction to Biotechnology and Introduction to Bioinformatics Cross-Disciplinary Course Series.
- Keyser, P., Elofsson, M., Rosell, S., & Wolf-Watz, H. (2008). Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *Journal of internal medicine*, 264(1), 17-29.
- Khusuma, A., Safitri, Y., Yuniarni, A., & Rizki, K. (2019). Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan *Escherichia coli* sebagai Bakteri Uji. *Jurnal Kesehatan Prima*, 13(2), 151-155.
- Kuswiyanto. (2017). *Bakteriologi Buku Ajar Analisis Kesehatan*. Jakarta.
- Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *J Sains & Teknologi*, 12(3), 265-276.

- Li, B., & Chen, J. Q. (2013). Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food. *Bmc Microbiology*, 13, 1-13.
- Liwan, S. Y., & Budiarmo, T. Y. (2018). Monitoring of pollution of *Salmonella* sp. In raw milk using virulence gen marker. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 15(2), 54-60.
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. (2019). *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 270.
- Mandal, S., Mandal, M. D., & Pal, N. K. (2009). In vitro activity of *gentamicin* and *amikacin* against *Salmonella enterica* serovar Typhi: a search for a treatment regimen for *tifoid fever*. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 15 (2), 264-268, 2009.
- Marchello, C. S., Carr, S. D., & Crump, J. A. (2020). A systematic review on antimicrobial resistance among *Salmonella* Typhi worldwide. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 103(6), 2518.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection*, 2(2), 145-156.
- Mariana, N., Indriyati, I., Widiyanti, A. D., Taufik, M., Wijaya, C., Hartono, T. S., ... & Firmansyah, I. (2021). Gambaran Kuantitatif Antibiotik Menggunakan Metode Defined Daily Dose (DDD) Di Ruang Rawat Inap RSPI Prof. Dr. Sulianti Saroso Pada Januari-Juni 2019. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 7(1), 37-42.
- Mashayekh, Z., Moradi Bidhendi, S., & Khaki, P. (2022). Detection of *invA*, *sivH*, and *agfA* Virulence Genes in *Salmonella* spp. Isolated from Broiler Breeder Farms in Alborz Province, Iran. *Archives of Razi Institute*, 77(2), 607-614.
- Mileva, R., Milanova, A., Al-Shammari, A. M., Al-Mudhafr, M. A., Al-Grawi, E. C., Al-Hili, Z. A., ... & Binev, R. (2022). ISSN 1311-1477. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 25(1).
- Mohammed, B. T. (2022). Identification and bioinformatic analysis of *InvA* gene of *Salmonella* in free range chicken. *Brazilian Journal of Biology*, 84.
- Muhsinin, S., Sulastri, M. M., & Supriadi, D. (2019). Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. Dengan Metode PCR. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(3), 191-200.
- Mutai, W. C., Muigai, A. W., Waiyaki, P., & Kariuki, S. (2018). Multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates with reduced susceptibility to *ciprofloxacin* in Kenya. *BMC microbiology*, 18(1), 1-5.

- Nurhamidah, S., Djide, M. N., Arfiansyah, R., & Nainu, F. (2018). Deteksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dalam produk pangan siap saji menggunakan metode PCR, Melt Curve, dan analisis HRM. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 22(1), 20-26.
- Nurhidayati, S., Faturrahman, F., & Ghazali, M. (2015). Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, 1(2).
- Oktaviani, M., Fadhli, H., & Yuneistya, E. (2019). Uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) dengan metode difusi cakram. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(1), 8.
- Pradipta, I. S., Febrina, E., Ridwan, M. H., & Ratnawati, R. (2012). Identifikasi pola penggunaan antibiotik sebagai upaya pengendalian resistensi antibiotik. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*, 1(1), 16-24.
- Pratiwi, R. H. (2017). Mekanisme pertahanan bakteri patogen terhadap antibiotik. *Jurnal pro-life*, 4(3), 418-429.
- Purwaningsih, D., & Wulandari, D. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*: Potential of Antibacterial Compound Fermentation of Endophytic Bacteria from Taro Tuber (*Colocasia esculenta* L.) againsts *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.)*, 3(5), 750-759.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galan, J. E., Ginocchio, C., ... & Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes*, 6(4), 271-279.
- Reddy, P. R., & Raju, N. (2012). Gel-electrophoresis and its applications. Gel Electrophoresis-Principles and basics, *InTech*, 15-32.
- Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., & Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. *Deutsches Ärzteblatt International*, 105(39), 657.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved list of bacterial names. *Internat. J. System. Bacteriol*, 30(225), 420.
- Tang, H. J., Chen, C. C., Zhang, C. C., Cheng, K. C., Chiang, S. R., Chiu, Y. H., ... & Chuang, Y. C. (2012). Use of Carbapenems against clinical, nontifoid *Salmonella* isolates: results from in vitro and in vivo animal studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 2916-2922.
- Umair, M., & Siddiqui, S. A. (2020). Antibiotic susceptibility patterns of *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* in a tertiary care hospital in Islamabad. *Cureus*, 12(9).

- Veteriner, D. P., & Veteriner, D. P. (2017). Identifikasi Bakteri pada Eksoskeleton Lalat di Beberapa Pasar di Surabaya. *Journal of Parasite Science (J. Parasite Sci.)* Vol, 1(1).
- VT Nair, D., Venkitanarayanan, K., & Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-resistant Salmonella in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, 7(10), 167.
- Weinstein, M. P. (2021). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. West Valley, Utah: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Wijayati, N., Astutiningsih, C., & Mulyati, S. (2014). Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), 24-28.
- Yanestria, S. M., Rahmaniar, R. P., Wibisono, F. J., & Effendi, M. H. (2019). Detection of *InvA* gene of Salmonella from milkfish (*Chanos chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Veterinary world*, 12(1), 170.
- Yulian, R., Narulita, E., Iqbal, M., Sari, D. R., Suryaningsih, I., & Ningrum, D. E. A. F. (2020). Detection of virulence and specific genes of Salmonella sp. indigenous from Jember, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7).
- Zelpina, E., Walyani, S., Niasono, A. B., & Hidayati, F. (2020). Dampak infeksi Salmonella sp. dalam daging ayam dan produknya terhadap kesehatan masyarakat. *Journal of Health Epidemiology and Communicable Diseases*, 6(1), 25-32.
- Zuhriana, K. Y. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(6), 1-6.