

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

Kirby Saputra<sup>1</sup>, Daniel Chandra<sup>1</sup>, Johan Lucianus<sup>1</sup>, Ernawati A. Giri Rachman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha,

Jl. Prof. Drg. Suria Sumantri MPH No. 65 Bandung 40164 Indonesia

<sup>2</sup> Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

Jl. Ganesha 10 Bandung 40132 Indonesia

## Abstract

A number of researchers in endemic regions in Asia have proved that mutations in *Quinolone Resistant Determining Regions* (QRDRs), parts of *gyrA* gene of *Salmonella typhi*, can reduce the susceptibility of ciprofloxacin therapeutic in enteric fever. The sites of amino acid mutations in QRDRs in relation with decreased fluoroquinolone susceptibility are different in each endemic region. The present study 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 the antimicrobial susceptibility test applying the Kirby-Bauer method of disk diffusion with ciprofloxacin and were examined by PCR and direct nucleotide sequencing for genetic alteration in QRDRs. One ciprofloxacin sensitive isolate was observed and it showed no mutation; ciprofloxacin resistant galurs were observed in 2 isolates and they also showed no mutation. The data imply that QRDRs mutations in this research are not associated with fluoroquinolone resistance in clinical and typical Indonesian *Salmonella typhi* isolates. It is suggested that nucleotide re-sequencing should be used to verify this result.

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

## Pendahuluan

Demam tifoid masih merupakan masalah serius di seluruh dunia terutama pada wilayah yang sanitasinya buruk. WHO mencatat secara global bahwa insidensi demam tifoid adalah 21 juta kasus setiap tahunnya. Angka kematian insidensi global tersebut mencapai 1-4% dan 90% kematian tersebut terjadi di Asia. Survei tahun 2001 di Indonesia menunjukkan bahwa demam tifoid menempati urutan ke-3 dari 10 penyakit utama penyebab kematian dengan prevalensi 9,4% dengan 170.324 kasus.<sup>1</sup> Kasus-kasus pada daerah endemis cenderung untuk mengalami kegagalan pengobatan terhadap beberapa

antibiotik yang disebut *Multi-Drugs Resistance*.<sup>2</sup> *Multi Drugs Resistance Salmonella typhi* (MDR-ST) tercatat mulai muncul pada tahun 1989. Berbeda dari masa sebelumnya MDR-ST tidak dapat mati dengan terapi *the three first-line antibiotics* yaitu *chloramphenicol*, *ampicillin* dan *trimethoprim*.<sup>3,4,5,6,7</sup> MDR-ST juga cenderung untuk mengalami resistensi terhadap *fluoroquinolone* pada dekade terakhir ini padahal *fluoroquinolone* merupakan *first line antibiotic* untuk mengeradikasi MDR-ST pada masa kini.<sup>3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14</sup> MDR-ST yang resisten terhadap *fluoroquinolone* dijumpai di daerah-daerah endemis seperti India, wilayah Amerika latin,

Cina, Korea dan wilayah Asia Tenggara seperti Vietnam serta Filipina pada dekade terakhir ini. Pada penelitian di negara-negara endemis tersebut didapatkan bahwa resistensi yang terjadi berhubungan dengan terjadinya mutasi pada QRDRs gen *gyrA* *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Mutasi tersebut menurunkan interaksi *fluoroquinolone* dengan *active site* DNA *gyrase* yang berakibat pada timbulnya resistensi. Posisi mutasi pada gen *gyrA* tersebut juga ternyata berbeda pada tiap negara.<sup>3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14</sup> Tujuan penelitian ini adalah mencari pola mutasi QRDRs gen *gyrA* pada sampel-sampel *S. typhi* isolat klinik dan galur khas Indonesia.

### Bahan dan Cara

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan menggunakan 3 sampel isolat klinik *S. typhi*, satu diantaranya telah dikarakterisasi sebagai *S. typhi* galur khas Indonesia.<sup>15</sup> Pada penelitian ini dilakukan tes resistensi semua sampel terhadap antibiotika *fluoroquinolone* sebagai langkah awal untuk menentukan sejauh mana tingkat resistensi sampel *S. typhi* yang merupakan isolat klinik dan galur khas

Indonesia. Uji resistensi dilakukan dengan metode Kirby-Bauer *Disk Diffusion Test* sesuai standar CLSI *guidelines*.<sup>4,5</sup> Penelitian ini dilanjutkan dengan amplifikasi gen *carbamoyl phosphate synthetase* dengan menggunakan primer *ca8* dan *ca9* untuk memastikan bahwa sampel-sampel yang digunakan merupakan *S. typhi*.<sup>16</sup> Penelitian dilanjutkan dengan amplifikasi gen *gyrA* dengan metode PCR menggunakan primer *gyrA FWD* dan *gyrA-REV* dengan kondisi optimal yang sudah ditemukan dari penelitian sebelumnya dengan modifikasi pada temperaturnya.<sup>17</sup> Penelitian dilanjutkan dengan tahapan sekuensing satu arah dengan primer *gyrA-FWD* pada nukleotida hasil PCR dan diakhiri dengan analisis pola mutasi pada gen *gyrA* serta ekspresinya pada asam amino dengan menggunakan *software* pada *website* NCBI untuk menentukan pola mutasi khas sampel *S. typhi*.

### Hasil dan Pembahasan

Hasil uji resistensi sampel terhadap *fluoroquinolone* ditunjukkan pada Tabel 1. Percobaan ini juga menggunakan *Escherichia coli* sebagai galur kontrol kualitas. Hasil uji kontrol kualitas ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Hasil Uji Resistensi Antibiotik terhadap Sampel

Nama sampel	Zona Inhibisi	Standar Kriteria Zona Inhibisi		
		Sensitif	Intermediete	Resisten
ST7	32 mm	>= 30 mm	16-29 mm	<= 15 mm
ST11	10 mm			
ST22	14 mm			
Kontrol -	nol			

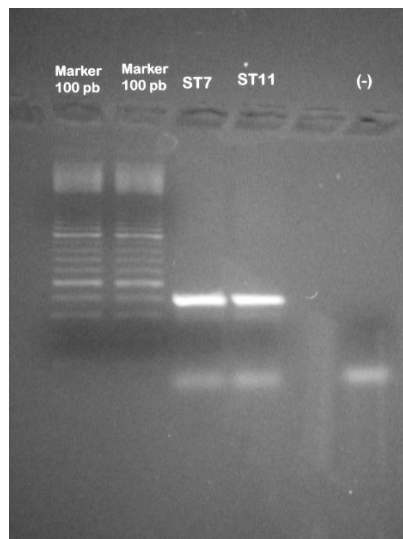
Tabel 2. Hasil Uji Kontrol Kualitas

Kontrol Kualitas	Zona Inhibisi	Standar Kriteria Validitas
<i>Escherichia coli</i>	32 mm	30-40 mm

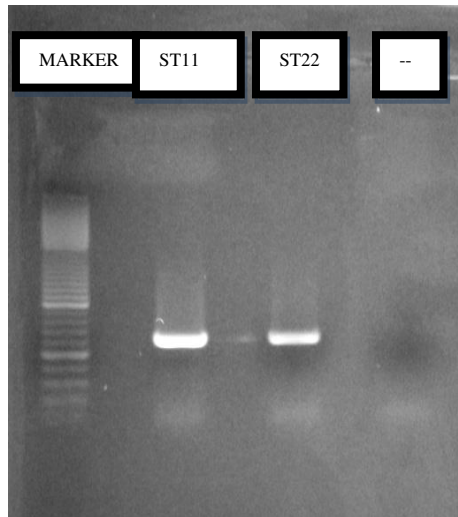
Sesuai standar kriteria zona inhibisi CLSI *guidelines* maka ST7 tergolong sensitif sedangkan ST11 dan ST22 tergolong resisten terhadap *fluoroquinolone*. Hasil uji kontrol kualitas membuktikan bahwa percobaan ini valid.

Templat DNA *S. typhi* yang telah diisolasi yaitu ST7 dan ST11, diamplifikasi menggunakan primer *Ca8* dan *Ca9*.<sup>16</sup> Hasil yang didapat yaitu pita spesifik yang terletak antara pita ke-3 dan ke-4 *marker* sehingga sesuai panjang pita yang diharapkan yaitu 387 pasang basa (pb). Hasil tersebut menunjukkan bahwa templat yang digunakan adalah

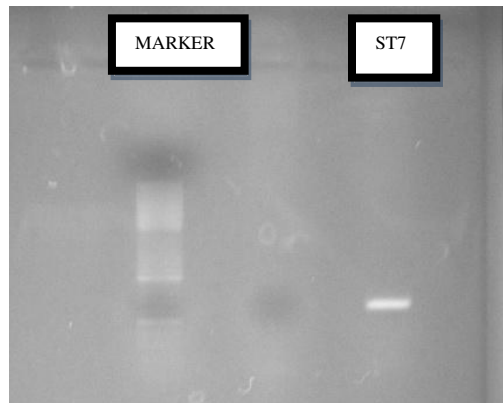
templat DNA *S. typhi*.<sup>16</sup> Templat ST22 telah diamplifikasi sebelumnya dengan primer yang sama dan dibuktikan merupakan templat DNA *S. typhi*.<sup>17</sup> Hasil amplifikasi QRDRs gen *gyrA* dengan menggunakan primer *gyrA-FWD* dan *gyrA-REV* pada ketiga sampel menunjukkan hasil yang spesifik seperti ditunjukkan pada Gambar 1 dan Gambar 2. Pita-pita DNA sampel terletak diantara pita ke-6 dan ke-7 *marker* sehingga hasil tersebut sesuai dengan jumlah pasang basa yang diharapkan dari QRDRs gen *gyrA* yaitu 627 pb.



Gambar 1. Hasil PCR ST7 dan ST11 dengan Primer *Ca8* dan *Ca9*



**Gambar 2.** Hasil PCR ST11 dan ST22 dengan Primer *gyrA-FWD* dan *gyrA-REV*



**Gambar 3.** Hasil PCR ST7 dengan Primer *gyrA-FWD* dan *gyrA-REV*

Proses sekuensing hasil PCR dilakukan oleh Macrogen Inc., Korea Selatan. Deteksi pola mutasi dilakukan pada hasil sekuensing DNA (basa nukleotida dan asam amino) ketiga sampel. *S. typhi* galur Ty2 (*Gen Bank accession number* NC 004631) digunakan

sebagai standar pembandingan urutan asam amino terhadap sampel. Hasil deteksi pada asam amino sampel ditunjukkan pada tabel 3, 4 dan 5 dengan *highlight* kuning sebagai penanda daerah QRDRs.

**Tabel 3.** Perbandingan Asam Amino QRDRs ST7 dan Ty2

ST 7	Perbandingan
Urutan Asam Amino	
ST7 1	LDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHG 60
Ty2 22	LDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHG 81
ST7 61	DSAVYDTIVRMA 72
Ty2 82	DSAVYDTIVRMA 93

**Tabel 4.** Perbandingan Asam Amino QRDRs ST11 dan Ty2

ST11	Perbandingan
Urutan Asam Amino	
ST11 6	YAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDS 65
Ty2 24	YAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDS 83
ST11 66	AVYDTIVRMAQPFLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRLAKIAHGLMADLEKETV 125
Ty2 84	AVYDTIVRMAQPFLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRLAKIAHGLMADLEKETV 143
ST11 126	DFVDNYDGTTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGGMATNIPPHNLTEVINGCLAYIDNEDI 185
Ty2 144	DFVDNYDGTTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGGMATNIPPHNLTEVINGCLAYIDNEDI 203

**Tabel 5.** Perbandingan Asam Amino QRDRs ST22 dan Ty2

ST22	Perbandingan	Urutan	Asam Amino
ST22 1	LDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMN	VLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHG	60
Ty2 22	LDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMN	VLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHG	81
ST22 61	DSAVYDTIVRMAQPFLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRLAKIAHGLMADLEKE		120
Ty2 82	DSAVYDTIVRMAQPFLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRLAKIAHGLMADLEKE		141
ST22 121	TVDFVDNYDGTTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGGMATNIPPHNLTEVINGCLAYIDNE		180
Ty2 142	TVDFVDNYDGTTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGGMATNIPPHNLTEVINGCLAYIDNE		201

Hasil deteksi urutan asam amino pada ST7 tidak menunjukkan adanya perubahan asam amino. Hal ini sesuai dengan teori dan literatur bahwa pada galur yang sensitif terhadap *fluoroquinolone* tidak ditemukan adanya mutasi pada QRDRs gen *gyrA*.<sup>3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14</sup> Pada ST11 dan ST22 juga tidak ditemukan adanya

mutasi pada QRDRs gen *gyrA*. Mutasi juga tidak ditemukan pada Ser83 dan Asp87 yang merupakan daerah dengan frekuensi mutasi tertinggi pada *S. typhi* yang resisten terhadap *fluoroquinolone*. Peneliti menduga bahwa mutasi mungkin saja terjadi pada: daerah lain di luar QRDRs pada gen *gyrA*, *gyrB*, *parC* ataupun *parE*.<sup>5,8,12</sup> Keempat gen tersebut

merupakan daerah yang mutasinya bisa menimbulkan resistensi *S. typhi* terhadap *fluoroquinolone* sehingga

### Simpulan

Pada sampel ST7, yang sensitif terhadap *fluoroquinolone*, tidak ada mutasi yang terjadi baik pada urutan basa nukleotida maupun yang terekspresi pada asam aminonya. Tidak terdapatnya mutasi pada ST7 sesuai dengan teori dan literatur bahwa pada galur yang sensitif terhadap *fluoroquinolone* tidak dijumpai adanya mutasi pada QRDRs gen *gyrA*.

Pada sampel ST11 dan ST22, yang resisten terhadap *fluoroquinolone*, tidak didapatkan mutasi baik, secara urutan basa nukleotida maupun yang terekspresi pada pola asam aminonya. Perubahan ekspresi asam amino pada Ser83 dan Asp87, yang mayoritas terjadi pada *Salmonella typhi* yang resisten terhadap *fluoroquinolone*, juga tidak terdapat pada QRDRs gen *gyrA* sampel ST11 dan ST22.

Pada penelitian ini tidak didapatkan adanya korelasi antara mutasi pada QRDRs gen *gyrA* DNA sampel dengan sifat resistensi sampel.

### Saran

1. Penelitian menggunakan lebih banyak sampel terutama sampel yang merupakan galur khas Indonesia.
2. Penelitian dapat dimanfaatkan untuk menciptakan sistem deteksi dalam pengobatan demam tifoid yang efektif dan spesifik.
3. Sekuensing ulang secara optimal diperlukan untuk mengklarifikasi hasil penelitian ini.

### Ucapan Terima kasih

memungkinkan timbul dugaan bahwa mutasi dapat terjadi di daerah tersebut.

Terimakasih kepada Dra. Endang Sriatimah, analis laboratorium Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung, atas bimbingannya selama penelitian. Terimakasih juga atas pendanaan penelitian ini oleh Riset KK Biokimia FMIPA ITB 2008.

### Daftar Pustaka

1. WHO. Indonesia: enviromental health country profile. 2004 [cited 2008 June 20]. Available from: <http://www.who.int/>.
2. WHO. Weekly epidemiological report. 2008 [cited 2008 June 20]. Available from: <http://www.who.int/wer>.
3. Renuka K, Sood S, Das BK, Kapil A. High level ciprofloxacin resitance in *Salmonella enteric* serotype *typhi* in India. 2008 [cited 2008 June 20]. Available from:<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/1/36/6/1595>.
4. Ahmed D, D'Costa LT, Alam K, Hossain MA. Multidrugs resistant *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates with high level resitance to ciprofloxacin in Dhaka, Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:3516-7.
5. Mirza SH, Khan MA. Low level quinolone-resistance in multidrugs-resistant typhoid. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 2008; 18:13-6.
6. Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jarneson L. *Harrison's principles of internal medicine*. 16<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Proffesional, 2004.
7. Katzung BG. *Basic & clinical pharmacology*. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Proffesional, 2005.
8. Li FH, Jia BL, Ying Y, Xu L. Mutations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and *ParC* subunit of topoisomerase IV in clinical strains of *fluoroquinolone*-resistant *Shigella* in Anhui, China. *The*

- Microbiological Society of Korea 2007; 45:168-70.
9. Hirose K, Hashimoto A, Tamura K, Kawamura Y, Ezaki T, Sagara H. et al. DNA Sequence analysis of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV quinolone resistance-determining regions of *Salmonella enterica* serovar *typhi* and serovar *paratyphi* A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3249-52.
  10. Slinger R, Desjardins M, McCarthy AE, Ramotar K, Jessamine P, Guibord C. et al. Suboptimal clinical response to ciprofloxacin in patients with enteric fever due to *Salmonella* spp. with reduced fluoroquinolone susceptibility: a case series. *BMC Infectious Disease* 2004; 4:1471-2334.
  11. Threfall EJ, Ward LR. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enteric* serotype *typhi*, United Kingdom. *Laboratory of Enteric Pathogen* 2001; 7.
  12. Turner, Nair S, Wain J. The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhi* by accumulation of point mutation in the topoisomerase target. 2008 [cited 2008 June 20]. Available from: [www.jacoxfordjournals.org/cgi/content/full/58/4/733](http://www.jacoxfordjournals.org/cgi/content/full/58/4/733).
  13. Capoor MR, Nair D, Aggarwal P, Mathys V, Dehem M, Bifani PJ. *Salmonella enterica* serovar *typhi*: Molecular analysis of strains with decreased susceptibility and resistant to ciprofloxacin in India from 2001-2003. *The Brazilians Journal of Infectious Diseases* 2007; 11:423-5.
  14. Hakkanen AJ, Lindgren M, Huovinen P, Jalava J, Siitonen J, Kotilainen P. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enteric*: Nalidixic acid susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5775-8.
  15. Giri Rachman EA, T Robertus, S Hadi. PCR for detection *Salmonella typhi* galurs from Indonesia. *Proceedings on International Conference of Natural and Mathematical Science.* ITB. Bandung: International Conference on Natural and Mathematical Science.
  16. A. Rudiretna Gen mirip Car A pada *Salmonella typhi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung. 1998. Desertasi Program Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung.
  17. D. Chandra. Optimasi amplifikasi bagian gen *gyrA* dengan metode PCR pada isolat *Salmonella typhi* dari Rumah Sakit Immanuel Bandung. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, 2008, Karya Tulis Ilmiah.

