



Evaluasi Keberadaan Gen *catP* terhadap Resistensi Kloramfenikol Pada Penderita Demam Tifoid

JAMILAH

Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan,
UIN Alauddin Makassar
Jl. Sultan Alauddin 36 Samata, Kab. Gowa 92113
email: jamilah@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Demam tifoid atau *typhus abdominalis* merupakan salah satu penyakit infeksi yang dilaporkan tinggi angka kejadiannya. Penyakit ini disebabkan oleh *Salmonella typhi*, bakteri gram negatif yang menimbulkan infeksi akut pada usus kecil. Patogenesis penyakit ini tergantung pada inokulum, kemampuan virulensi, respon sistem imun inang dan faktor protektif lokal. Terapi antibiotik merupakan langkah penting dilakukan ketika dugaan klinik telah kuat. Kloramfenikol merupakan antibiotik yang memiliki mekanisme kerja menghambat enzim peptidil transferase yang berperan dalam pembentukan ikatan-ikatan peptida dalam proses sintesis protein bakteri. Adanya resistensi terhadap kloramfenikol mempengaruhi efektifitas jenis antibiotik ini digunakan dalam terapi demam tifoid. *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol memiliki gen *catP* yang mengkode asetil transferase membentuk asetoksikloramfenikol sehingga kloramfenikol menjadi inaktif. Untuk mendeteksi resistensi ini, dilakukan uji *disc diffusion* dan uji PCR. Sampel darah dari penderita demam tifoid dari tiga rumah sakit di Makassar dan Gowa dan satu puskesmas. Berdasarkan hasil uji, ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 37.7% dari uji *disc diffusion* dan 43,4% dari uji PCR. Kesesuaian hasil Uji untuk menemukan resistensi adalah 87.0% dan untuk sensitif terhadap kloramfenikol adalah 90.9%.

Kata Kunci: Demam tifoid, disc diffusion, gen *catP*, kloramfenikol, PCR, resistensi, *Salmonella typhi*

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit infeksi yang dilaporkan tinggi angka kejadiannya. Thong *et al.*, (1995) menyebutkan demam tifoid di Indonesia cukup tinggi yaitu 1000/100.000 jumlah penduduk setiap tahun. Di Sulawesi Selatan, angka kejadian penyakit ini mencapai 2.500/100.000 dan merupakan kasus dengan urutan ke empat yang paling sering terjadi dari 24 wilayah (Hatta *et al.*, 2002).

Demam tifoid disebabkan oleh *Salmonella typhi*, bakteri gram negatif yang menimbulkan infeksi akut pada usus kecil. Infeksi *S. typhi* ke dalam tubuh manusia terjadi karena mengkomsumsi makanan atau minuman yang telah terkontaminasi urin atau feses manusia, baik penderita maupun carrier (pembawa). Air yang terkontaminasi merupakan sumber infeksi utama. Demikian pula kerang-kerangan, sayuran yang ditanam dengan pupuk

organic (feses) dan makanan mentah lainnya dapat menjadi sumber infeksi.

Demam tifoid yang berat memberikan komplikasi pendarahan, perforasi usus dan peritonitis. Kelainan pada otak dapat terjadi berupa enselepati atau meningitis. Terapi antibiotik merupakan langkah penting dan sebaiknya segera dilakukan ketika dugaan klinik telah kuat. Hal ini dapat mengurangi komplikasi dan kasus fatal lainnya. Beberapa antibiotik yang sering digunakan antara lain, kloramfenikol, ampisilin dan o-trimokzasol (Mirza *et al.*, 2000).

Kloramfenikol merupakan agen Gold standar dalam pengobatan tifoid (Islam *et al.*, dalam Shanahan *et al.*, 1998). Kloramfenikol merupakan antibiotik yang memiliki mekanisme kerja menghambat enzim peptidil transferase yang berperan dalam pembentukan ikatan-ikatan peptida dalam proses sintesis protein bakteri. Pembentukan ikatan peptida



akan terus dihambat selama obat tetap terikat pada ribosom.

Keefektifan kloramfenikol sebagai terapi antibiotik juga diakui disarming harganya yang relatif murah. Namun demikian peneliti diberbagai Negara telah melaporkan adanya strain *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol. Resistensi terhadap kloramfenikol pertama kali dilaporkan di Meksiko pada tahun 1973 (Olarde dan Emma, 1973), Korea pada tahun 1992 (Lee *et al.*, 2004), Vietnam tahun 1993 (Connerton *et al.*, 2000) dan India pada tahun 1997 (Shanahan *et al.*, 1998).

Secara umum, faktor yang mempengaruhi terjadinya resistensi antibiotik adalah penggunaan antibiotik yang berlebihan, pemilihan antibiotik yang salah, pemberian antibiotik yang kurang tepat dan faktor instrinsik mikroba berupa plasmid. Adapun resistensi terhadap kloramfenikol sendiri diperantarai oleh plasmid (Rowe *et al.*, 1990 dalam Shanahan *et al.*, 1998). *Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol memiliki plasmid yang mengandung gen Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (Praseno, 1989 dan Wattimena dkk., 1991). Demikian pula pada gen catP, menurut Haque, 2006; Gen catP adalah gen yang mengkode sintesis enzim asetil transferase yang dapat mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan asetoksikloramfenikol sehingga kloramfenikol menjadi inaktif.

Salah satu cara untuk mengetahui keberadaan suatu gen diperlukan suatu teknik molekuler. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dikembangkan untuk mempercepat diperolehnya hasil identifikasi jenis bakteri tertentu berdasarkan urutan nukleotidanya. PCR adalah teknik molekuler yang mengamplifikasi urutan nukleotida yang menjadi target. Teknik ini sangat sensitive dan spesifik. Song *et al.*, 1993 melaporkan *S.typhi* dapat dideteksi dengan sangat akurat melalui nested PCR. Hal ini diperkuat oleh Haque *et al.*, 2001, Kumar *et al.* 2002, Massi *et al.*, 2003 dan Prakash *et al.*, 2005).

Berdasarkan Kemampuan teknik PCR dalam mengamplifikasi urutan nukleotida pada gen tertentu sebagai target maka gen catP yang merupakan gen resisten terhadap kloramfenikol pada *S.typhi* dapat pula dideteksi. Dengan mendeteksi keberadaan gen catP ini maka keputusan mengenai pemilihan antibiotik yang tepat dapat segera dilakukan. Hal tersebut pada gilirannya dapat mengurangi bahkan mencegah kegagalan terapi demam tifoid.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah dari 53 penderita demam tifoid yang diambil dari bagian interna RS. Wahidin Sudiro Husodo, RSUD Daya, Puskesmas Kassi-Kassi dan RSUD Gowa. Medium Oxbile Broth (Merck), Salmonella-Shigella Agar (SSA), Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Solid Indol Motility (SIM), Methyl Red Voges Proskauer (MRVP). Simon Citrat Agar (SCA), Urea dan Uji gula-gula (Glukosa, laktosa, sukrosa dan manitol). Pewarnaan Gram, Larutan NaCl 0,9%, Mueller Hilton Agar (Merck), *Paper Disc* dengan konsentrasi kloramfenikol, *High Purity analytical grade celite* (Diatom) (Jensen Chemica, Beere, Belgium 10.846.79), GusCCN (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, Cat. No. 50990), NaOH, Triton x-100 (Roche, 78904), Buffer L2, Buffer L6, Etanol 70%, EDTA, Aseton, Buffer TE, Aquades steril, Taq Polymerase (Takara Bio, Inc. Japan), dNTPs (Takara Bio, Inc. Japan), Primer ST1, ST2, ST3, ST4 (Fasmac, Food Assessment and Management, Japan), gel agarosa 2%, Buffer TBE, Loading Buffer, EtBr. **Alat** yang digunakan cawan petri, neraca analitik, incubator, autoklaf, tabung pengenceran, tabung eppendorf, vortex shaker, waterbath, centrifuse, pomp vakum, stopwatch, gyratory shaker, freezer -20 °C, mikropipet, tip filter, DNA thermal cycler (mesin PCR), lemari pendingin 4 °C, mesin elektroforesis, perangkat UV light, kaca mata anti UV, kamera digital. **Cara kerja**, pada sampel darah dilakukan uji *disc diffusion* dan PCR. Untuk uji *disc diffusion*, dilakukan pengenceran suspensi *Salmonella typhi* dari



kultur untuk mengetahui tingkat kekeruhan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5. Pada kepekaan yang sesuai dengan 0,5 standar Mc Farland mengandung bakteri $1,5 \times 10^8$ /ml. Bakteri kemudian ditanam pada permukaan agar Mueller Hilton. Diameter zona hambatan yang terbentuk diukur berdasarkan diameter zona hambatan menurut Oxoid yang mengacu pada criteria *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) dengan kategori resisten (≤ 12 mm), intermediate (13-14 mm) (≥ 18 mm). Untuk uji PCR, dilakukan isolasi DNA kultur *S.typhi* dengan teknik Boom (Boom *et al.*, 1990), deteksi gen flagellin *S.typhi* dengan nested PCR (Song *et al.*, 1993) menggunakan primer ST1 dan ST2 pada amplifikasi pertama dan primer ST3 dan ST 4 pada amplifikasi ke dua Amplifikasi pertama dilakukan sebanyak 40 siklus. Setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C

selama 1 menit, annealing pada suhu 57 °C selama 1 menit 30 detik dan suhu 72 °C selama 3 menit. Amplifikasi kedua dikerjakan sebanyak 40 siklus dan setiap siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, annealing 68°C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72 °C selama 3 menit. Deteksi resistensi kloramfenikol gen catP dengan PCR dengan primer catP *forward* (CPNF) dan *reverse* (CPNR) dimana amplifikasi dilakukan untuk 30 siklus amplifikasi. Untuk setiap siklus terdiri denaturasi pada temperatur 94 °C selama 1 menit, annealing pada temperatur 55 °C selama 1 menit dan elongasi pada temperatur 72 °C selama 1 menit dan deteksi produk PCR dengan elektroforesis agarosa 2%. Data kemudian dianalisis secara diskriptif dengan analisa frekuensi dan uji korelasi spearman's rho dengan SPSS versi 12.0.

HASIL

Tabel 1. Frekuensi hasil uji *disc diffusion*

<i>Disc diffusion</i>	Frekuensi
Sensitif	33 (62.3 %)
Resisten	20 (37.7%)
Total	53 (100 %)

Tabel 2. Frekuensi hasil uji PCR

<i>Disc diffusion</i>	Frekuensi
Sensitif	30 (56.6 %)
Resisten	23 (43.4%)
Total	53 (100 %)

Hasil pengujian adanya resistensi terhadap kloramfenikol dengan *disc diffusion* menunjukkan nilai frekuensi untuk sensitive adalah 33 (62.3 %) dan resisten adalah 20 (37.7%). Pada uji PCR, menunjukkan nilai

frekuensi untuk sensitive adalah 30 (56.6 %) dan resisten adalah 23 (43.4%). Adapun perbandingan kedua uji tersebut dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian *Disc diffusion* dan PCR

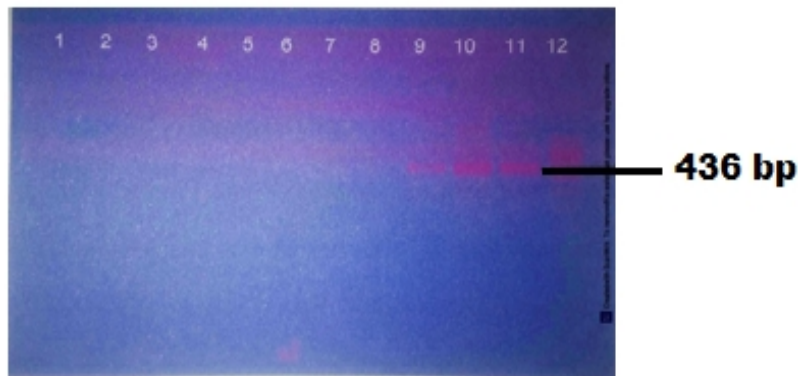
		<i>Disc diffusion</i>		Total	
		Resisten	Sensitif		
PCR	Resisten	Count	20	23	
		% within PCR	87.0%	13.0%	100%
		% within <i>Disc diffusion</i>	100%	9.1%	43.4%
		% of total	37.7%	5.7%	43.4%



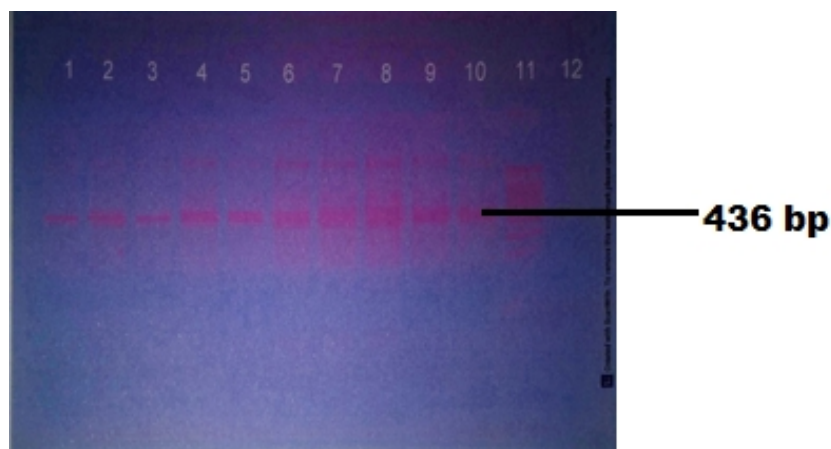
Sensitif	Count	0	30	30
	% within PCR	0%	100%	100%
	% within <i>Disc diffusion</i>	0%	90.9%	56.6%
	% of total	0%	56.6%	53
Total	Count	20	33	100%
	% within PCR	37.7%	62.3%	100%
	% within <i>Disc diffusion</i>	100%	100%	100%
	% of total	37.7%	62.3%	100%

Berdasarkan data pada tabel 3, jumlah penderita demam tifoid yang resisten terhadap kloramfenikol berdasarkan uji PCR dan *Disc diffusion* adalah 20 orang. Terdapat 3 orang yang dinyatakan resisten oleh uji PCR tetapi sensitive oleh uji *disc diffusion*. Tidak ada penderita yang dinyatakan resisten oleh uji *disc diffusion* tetapi sensitive oleh uji PCR.

Data menunjukkan pula bahwa berdasarkan uji *disc diffusion*, ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 37.7% dan berdasarkan uji PCR ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 43.4%. Adapun gambar produk amplifikasi gen *catP* dengan PCR dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Sumur 1: kontrol negatif, sumur 2-8: negatif gen *catP*, sumur 10-11: positif gen *catP* dan sumur 12: Ladder marker



Gambar 2. Sumur 1-10: positif gen *catP*, sumur 11: Ladder marker dan sumur 12: kontrol negatif



Deteksi adanya resistensi terhadap kloramfenikol dilakukan dengan dua uji yaitu *disc diffusion* dan PCR. Uji *disc diffusion* didasarkan pada zona inhibisi disekeliling disc paper yang mengandung kloramfenikol. Pada uji PCR, resistensi kloramfenikol dideteksi dengan mengamplifikasi gen *catP*. Gen *catP* adalah gen yang bertanggung jawab terhadap adanya resistensi kloramfenikol. Gen ini mengkode sintesis enzim chloramphenicol

Acetyltransferase, suatu enzim intraseluler yang mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan kloramfenikol sehingga kloramfenikol menjadi inaktif. Gen ini terdapat pada urutan basa 3601 sampai 4021, dengan jumlah 346-pasangan basa. Adapun urutan dari gen *catP* dapat dilihat pada gambar 3. (GenBank NCBI, www.Pubmed.com).

```
3601 gaagctaaaa tggagaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatatatc ccaatggcat
3661 cgtaaagaac attttgagge atttcagtca gttgctcaat gtacctataa ccagaccgtt
3721 cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacia gttttatccg
3781 gcctttatc acattcttgc ccgctgatg aatgctcatc cggattccg tatggcaatc
3841 aaagacggtg agctgggtgat atgggatagt gttcaccctt gttacaccgt tttccatgac
3901 caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg gcagtttctc
3961 cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctattt ccctaaaggg
4021 tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac cagttttga
4081 ttaaactgtg ccaatatgga caacttcttc gcccccgttt tcaccatggg caaatatta
4141 acgcaaggcg acaaggtgct gatgcccgtg gcgattcagg ttcacatgac cgtctgtgac
4201 ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga gtggcagggc
4261 ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgcccttaa cgcctggtgc tacgcctgaa
```

Gambar 3. Urutan gen *catP* dengan *Accession Number*: U46780

Berdasarkan data yang diperoleh, terdapat resistensi kloramfenikol dimana 20 orang dinyatakan resisten oleh PCR dan *disc diffusion*. Ada 3 orang yang nyatakan resisten oleh PCR tetapi sensitive oleh *disc diffusion*. Ini menunjukkan kemampuan PCR dalam mendeteksi gen *catP* yang belum terekspresi sehingga pada uji *disc diffusion* masih dinyatakan sensitive. Dari data mengenai uji resistensi inidiketahui bahwa berdasarkan uji *disc diffusion*, ditemukan resistensi sebesar 37.7% dan berdasarkan uji PCR ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 43.4%. Kesesuaian hasil kedua uji untuk menemukan resistensi adalah 87% dan untuk menemukan sensitive terhadap kloramfenikol adalah 90.9%. Berdasarkan uji korelasi Spaerman's rho menyatakan besar korelasi 0.889 dengan nilai p yaitu 0.000. Ini menunjukkan bahwa baik uji *disc diffusion*

maupun PCR atau sebaliknya sama bagusnya dalam kesahihan menguji resistensi terhadap klor amfenikol pada sampel darah. Bila simpulan pada hasil tersebut diemperiskan pada populasi lainnya maka deteksi resistensi terhadap kloramfenikol dapat dilakukan baik dengan uji PCR maupun dengan uji *disc diffusion*. Dengan demikian uji PCR untuk mendeteksi resistensi terhadap kloramfenikol berdasarkan gen *catP* dapat dilakukan disamping uji *disc diffusion*. Keuntungan dengan uji PCR adalah, dapat terdeteksinya *S.typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol meskipun jumlah bakteri tersebut masih sedikit (10 bakteri/ml) dan waktu yang dibutuhkan untuk mengetahui adanya *S.typhi* yang resisten atau sennsitif sangat singkat (± 1 hari) disbanding dengan uji *disc diffusion* (± 1 minggu).



KESIMPULAN

1. Terdapat *Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol pada uji PCR dan *disc diffusion*
2. berdasarkan uji *disc diffusion*, ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 37.7%
3. berdasarkan uji PCR ditemukan resistensi terhadap kloramfenikol sebesar 43.4%
4. berdasarkan nilai kesesuaian hasil kedua uji dan nilai korelasi, baik uji *disc diffusion* maupun PCR atau sebaliknya sama bagusnya dalam kesahihan menguji resistensi terhadap kloramfenikol pada sampel darah

DAFTAR PUSTAKA

- Boom, R., C.J.A. Sol, M.m.m. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim Van Dirn, and J. Van der Noorden, 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acid. The Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology. 1990, Vol. 28, No.3
- Connerton, Philippa, John, W., Tran, T.H., Tahir, A., Christopher, P., Nguyen, T., C., Ha, V., Vo. A. Ho, To S., D., Nicholas, P.J.D., Nicholas, J.W., Gordon, D., and Jeremy J.F. 2000. Epidemic Typhoid in Vietnam. Clinical Microbiology J.2000, 38(2) : 895-897.
- Hatta, M. Halim, M., Theresia, A., Jairo, G., and Henk, L.S. 2002. Antybody Response ini Typhoid Fever in Endemic Indonesia and The Relevance of Serology and Culture to Diagnosis. South East Asian J. Trop. Med. Public Health. 2002, Vol.33.No. 4: 724-750
- Haque, A., Naeem, A., Anwar, P., Abida, R., Samina., and Ghulam, A. 2001. Utility of PCR in Diagnosis of Problematic Cases of Typhoid. Japanesse Infectious Diseases J. 54:237-239.
- Haque, A., Abdul,H., Yasra, S., Aamir, A., Saira, B., Aysha, T., and Mushkooor, M. 2005. Identification of Drug resistance gene in Clinical Isolates of *Salmonella typhi* for Development of Diagnostic Multiplex PCR. Pak. Med. Sci. J. 2005, 21(4)
- Kumar, A., Vineet, A., Anu, B., and Sher, A. 2002. Detection of *Salmonella typhi* by Polymerase Chain Reaction : Implications in diagnosis of Typhoid Fever. Elsevier Sciences: Infection, Genetics and Evolution 2(2002): 107-108.
- Lee, K., Dongeun, Y., Yong, H.Y., Young, S.L., Hyun, S.K., Bok, K.L, Yunshop, C. 2004. Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar typhi in Korea. Antimicrob. Agents Chemotherapy J. 2004, 48(11): 4130-4135
- Massi, N.M., Toshiro, S., Akinobu, G., Acharya, B., M. Hatta, and Masato K. 2003. Rapid Diagnosis of Typhoid fever by PCR Assay Using One pair of Primers From Falgelin Gene of *Salmonella typhi* Infect Chermother. J. 2003, 3 : 233-237.
- Mirza, S., Kariuki, S., Mamun, K.Z., Beeching, N.J. and Hart, C.A. 2000. Analysis of Plasmid and Chromosomal DNA of Multidrug-resistants *Salmonella enteric* SerovarTyphi From Asia. Clinical Microbology J, 2000, 4: 1449-1452.
- Olarte, J. and Emma, G. 1973. *Salmonella Typhi* Resistant to Chloramphenicol, Ampicilin and Other Antimicrobial Agents: Strains Isolated During an Extensive Typhoid Fever Epidemic in Mexico Antimicrob. Agents Chemotherapy J. 1973, 4 : 597-601.
- Prakash, P., Om.,M., Alok, S., Anil., K.G. and Gopal, N. 2005. Evaluation of Nested PCR in Typhoid Fever. Clinical Microbiology. J. 2005, 43 (1):431-432.
- Praseno, 1989. Epidemiologi dan genetika resistensi bakteri terhadap antibiotika. Medika (11) 1984-1988
- Shanahan, M. A.Philippa, Mary, V.J., Christopher, J.T., and Sabastian G. Amyes. 1998. Molecular Analisis and Identification of antibiotic resistance in clinical Isolates of *Salmonella Typhi* from India. Clin. Microbiology. 1998, 36(6): 1595-1600
- Song, J. H., Helen, C., Y.P. Doe, S.M. Hee, B.M. and Chick. H. P. 1993. Detection of



Salmonella typhi in the blood of patients with typhoid fever by PCR. Clin. Microbiology J. 1993, 31 (6) 1439-1443

Thong, Kwai-Lin, Savitri, P., Rohani, M.Y., Pratiwi, S., Maria, P., eddy, S., Indro, H., Suttipan, S., and Tikki, P. 1995. Analysis of Salmonella typhi Type isolates from South East Asia by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Clin. Microbiology J. 1995, 33 (7): 1938-1941

Wattimena, R. J. Nelly, C. S., Mathilda B.W., Elin, Y.S. Andreanus, A.s., dan Anna, R.s. 1987. Farmokodinami dan Terapi antibiotik. Gajah Mada Press University; Yogyakarta.